

#7  
9/26/03  
C. Stipe

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 AOUT 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **13 AOUT 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9910493**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**  
DATE DE DÉPÔT **13 AOUT 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET LAVOIX**  
**2 Place d'Estienne d'Orves**  
**75441 PARIS CEDEX 09**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale  
☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant

téléphone

**BFF 99/0393****53-20-14-20**

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**Dérivés de phénanthroline-7-ones et leurs applications en thérapeutique.**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**LABORATOIRE L. LAFON**

Forme juridique

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

**19, Avenue du Professeur Cadiot 94701 MAISONS ALFORT**

Pays

**FR**En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

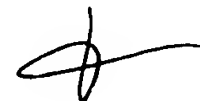
date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

**CABINET LAVOIX**  
**M. MONCHÉNY n° 92.1179**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		BFF 99/0393	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		99 10493	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)  Dérivés de phénanthroline-7-ones et leurs applications en thérapeutique.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>  LABORATOIRE L. LAFON			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		DELFOURNE Evelyne	
Prénoms			
Adresse	Rue	4, impasse du Liège	
	Code postal et ville	66450 POLLESTRES FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		DARRO Francis	
Prénoms			
Adresse	Rue	Avenue V. Olivier	
	Code postal et ville	Bâtiment 8A, Boîte 60 1070 BRUXELLES BELGIQUE	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BASTIDE Jean	
Prénoms			
Adresse	Rue	20, rue Antoine Carbo	
	Code postal et ville	66000 PERPIGNAN FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 16 Août 2000  C. JACOBSON n° 92.1119	

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2 / 2  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		BFF 99/0393	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		99 10493	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)  Dérivés de phénanthroline-7-ones et leurs applications en thérapeutique.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>  LABORATOIRE L. LAFON			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		KISS Robert	
Prénoms			
Adresse	Rue	4, Cour au Bois	
	Code postal et ville	1440 WAUTHIER-BRAINE BELGIQUE	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		FRYDMAN Armand	
Prénoms			
Adresse	Rue	10, allée des Fusains	
	Code postal et ville	91370 VERRIERES LE BUISSON FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 16 Août 2000  C. JACOBSON n° 92.1119	

**DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS**

[illegible]

La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques à base de composés polyaromatiques utiles notamment comme médicaments antitumoraux.

En 1999, les traitements cytotoxiques (chimiothérapie) utilisés pour réduire la taille des tumeurs cancéreuses, contenir le développement du processus tumoral voire, dans trop peu de cas encore, supprimer les amas de cellules cancéreuses et le risque de métastases, combinent des substances chimiques d'introduction récente avec d'autres qui sont utilisées depuis quelques dizaines d'années. Par exemple, au 5-fluorouracil (5-FU), reconnu depuis près de 40 ans comme l'un des traitements les plus actifs du cancer colo-rectal, peut être substitué l'un ou l'autre des inhibiteurs spécifiques de la topoisomérase I (irinotécan ou topotécan) lorsque la tumeur n'est plus sensible au 5-FU. Plus généralement, l'arsenal thérapeutique disponible pour traiter les tumeurs colo-rectales va également s'enrichir avec la mise à disposition de l'oxaliplatine, des nouveaux "donneurs" in situ de 5-FU ou des inhibiteurs sélectifs de la thymidylate synthétase. Cette co-existence ne se limite pas au traitement des cancers colo-rectaux puisque, également, la chimiothérapie des cancers du sein, de l'ovaire, du poumon fait maintenant largement appel à la famille des dérivés des taxanes (paclitaxel, docetaxel). Le besoin de traitements plus efficaces et mieux tolérés, améliorant ainsi la survie et la qualité de vie des malades est impérieux puisque, en prenant toujours l'exemple des tumeurs colo-rectales, il a été estimé (S.L. Parker, T. Tong, S. Bolden *et al.*, CA Cancer J. Clin., 1997) que, rien qu'aux Etats-Unis plus de 131 000 nouveaux cas ont été diagnostiqués en 1997, dont 54 000 étaient responsables du décès des patients. C'est la connaissance de cette situation qui a incité les inventeurs à s'intéresser à une famille de composés polyaromatiques encore peu étudiés, identifiés chez des Ascidies de mers chaudes, pour développer une chimie médicinale originale destinée à sélectionner des composés synthétiques issus d'un travail de conception/modulation chimique et doués d'une activité cytotoxique significative au plan thérapeutique.

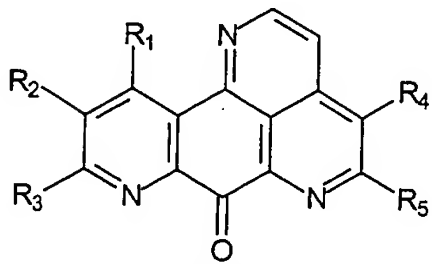
Les mers et les océans qui couvrent plus de 70 % de la surface du globe, hébergent des plantes marines et des éponges dont l'étude pharmacognosique systématique progressive montre que ces espèces vivantes peuvent contenir des alcaloïdes complexes présentant des propriétés pharmacologiques intéressantes. Par exemple, les éponges *Cryptotheca crypta* et *Halichondria okadai* font l'objet d'études approfondies depuis la découverte de la présence, dans leurs cellules, de cytarabine ou d'halichondrine B. Il en est de même pour la famille des tuniciers, depuis l'isolement de l'aplidine du tunicier *Aplidium albicans* qui vit dans les îles Baléares (Espagne). Des alcaloïdes à structure tétrahydroisoquinolone ont été isolés de l'ascidie *Ecteinascidia*

- turbinata*. Parmi ceux-ci, l'ecteina-scidin-743 fait l'objet de travaux pré-cliniques approfondis (E. Igbicka *et al.*, NCI-EORTC symposium, 1998; Abst. 130 p.34), ainsi que d'essais cliniques destinés à définir son potentiel thérapeutique comme médicament anticancéreux (A. Bowman *et al.*, NCI-EORTC symposium, 1998; Abst. 452 p.118 ;
- 5 M.Villanova-Calero *et al.*, NCI-EORTC symposium, 1998; Abst. 453 p.118 ; M.J.X. Hillebrand *et al.*, NCI-EORTC symposium, 1998; Abst. 455 p.119; E. Citkovic *et al.*, NCI-EORTC symposium, 1998; Abst. 456 p.119). De nouveaux dérivés d'acridines pentacycliques font également l'objet de travaux de pharmaco-chimie (D.J. Hagan *et al.*, J. Chem. Soc., Perkin Transf., 1997; 1: 2739-2746).
- 10 Autre alcaloïde naturel d'origine marine, l'ascididémine a été extraite du tunicier *Didemnum sp.* (J. Kobayashi *et al.*, Tetrahedron, Lett. 1988 ; 29 : 1177-80) et de l'ascidie *Cystodytes dellechiaiei* (I. Bonnard *et al.*, Anti-cancer Drug design 1995 ; 10 : 333-46).
- 
- L'ascididémine possède des propriétés antiprolifératives mises en évidence sur le modèle de leucémie murine (lignées P388 ou L1210) et décrites par F.J. Schmitz *et al.*
- 15 (J. Org. Chem. 1991 ; 56 : 804-8), B. Lindsay *et al.* (Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995 ; 5 : 739-42) et J. Kobayashi *et al.* (Tetrahedron Lett. 1988 ; 29 : 1177-80), et sur le modèle de leucémie humaine telles que décrites par I. Bonnard *et al.* (Anti-cancer Drug design 1995 ; 10 : 333-46). On peut également citer la 2-bromoleptoclinidone isolée de l'ascidie *Leptoclinides sp.* par S.J. Bloor *et al.* (J. Ann. Chem. Soc. 1987 ; 109 : 6134-6) et
- 20 synthétisée par F. Bracher *et al.* (Hétérocycles 1989 ; 29 : 2093-95) puis par M.E. Jung *et al.* (Hétérocycles 1994 ; 39 ; 2 : 767-778). La 2-bromoleptoclinidone présente une cytotoxicité sur le modèle cellulaire de leucémie avec une ED 50 de 0,4 µg/ml. Les propriétés cytotoxiques ont été confirmées, par F. Bracher (Pharmazie 1997 ; 52 : 57-60) aussi bien *in vitro* - sur soixante lignées cellulaires tumorales en culture - que *in vivo*
- 25 sur les modèles de xénogreffes de lignées cellulaires tumorales humaines (tumeurs du colon SW-620 et HTC116, tumeur rénale A498 et mélanome LOX IM VI) implantées chez des souris.
- D'autres composés dérivés de l'ascididémine tels que la 11-hydroxy ascididémine, la 11-méthoxy ascididémine, les 11-phényle et 11-nitrophényle ascididémynes, les 1-nitro
- 30 et 3-nitro ascididémynes et la néocalliactine ont été décrits au plan chimique par différentes équipes telles que celles de F.J. Schmitz (J. Org. Chem. 1991 ; 56 : 804-8) et de Y. Kitahara *et al.* (Heterocycles 1993 ; 36 : 943-46 ; Tetrahedron Lett. 1997 ; 38, 17029-38), G. Gellerman *et al.* (Tetrahedron Lett. 1993 ; 34 : 1827-30), S. Nakahara *et al.* (Heterocycles 1993; 36 : 1139-44), I. Spector *et al.* (US Patent Number : 5,432,172,
- 35 Jul. 11, 1995).

La méridine, est un autre alcaloïde naturel extrait de l'ascidie *Amphicarpa meridiana* ou de l'éponge marine *Corticum sp.* La méridine a été isolée par F.J. Schmitz *et al.* (J. Org. Chem. 1991; 56: 804 - 808) puis décrite pour ses propriétés antiprolifératives sur modèle de leucémie murine (P388) et antifongiques dans le brevet US A5 182 287 (Gunawardana *et al.* du 23 Janvier 1993). Ses propriétés cytotoxiques sur deux lignées cellulaires humaines: cellules de cancer du colon (HT-29) et carcinome du poumon (A549) ont été rapportées par R.E. Longley *et al.* (J. of Nat. Products 1993; 56: 915-920).

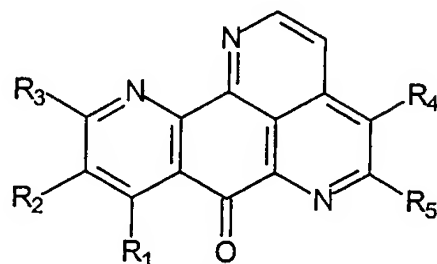
Parmi ces composés, on peut citer également la cystodamine, alcaloïde pentacyclique isolé de l'ascidie *Cystodytes dellechiaiei* par N. Bontemps *et al.* (Tetrahedron lett., 1994; 35 : 7023-7026) qui présente une activité cytotoxique sur des lymphoblastes de leucémie humaine.

La présente invention a pour objet des composés de formule générale (I) et (Ia) :



Formule I

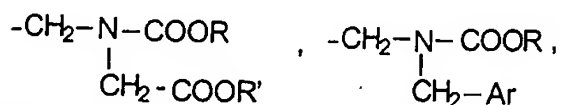
et



Formule Ia

dans lesquelles

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> sont choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hydroxy, -CHO, -OR, -COOH, -CN, -CO<sub>2</sub>R, -CONHR, -CONRR', -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOR, morpholino, nitro, SO<sub>3</sub>H et



R et R' étant choisis parmi les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> et Ar étant un groupe aryle en C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>,



et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

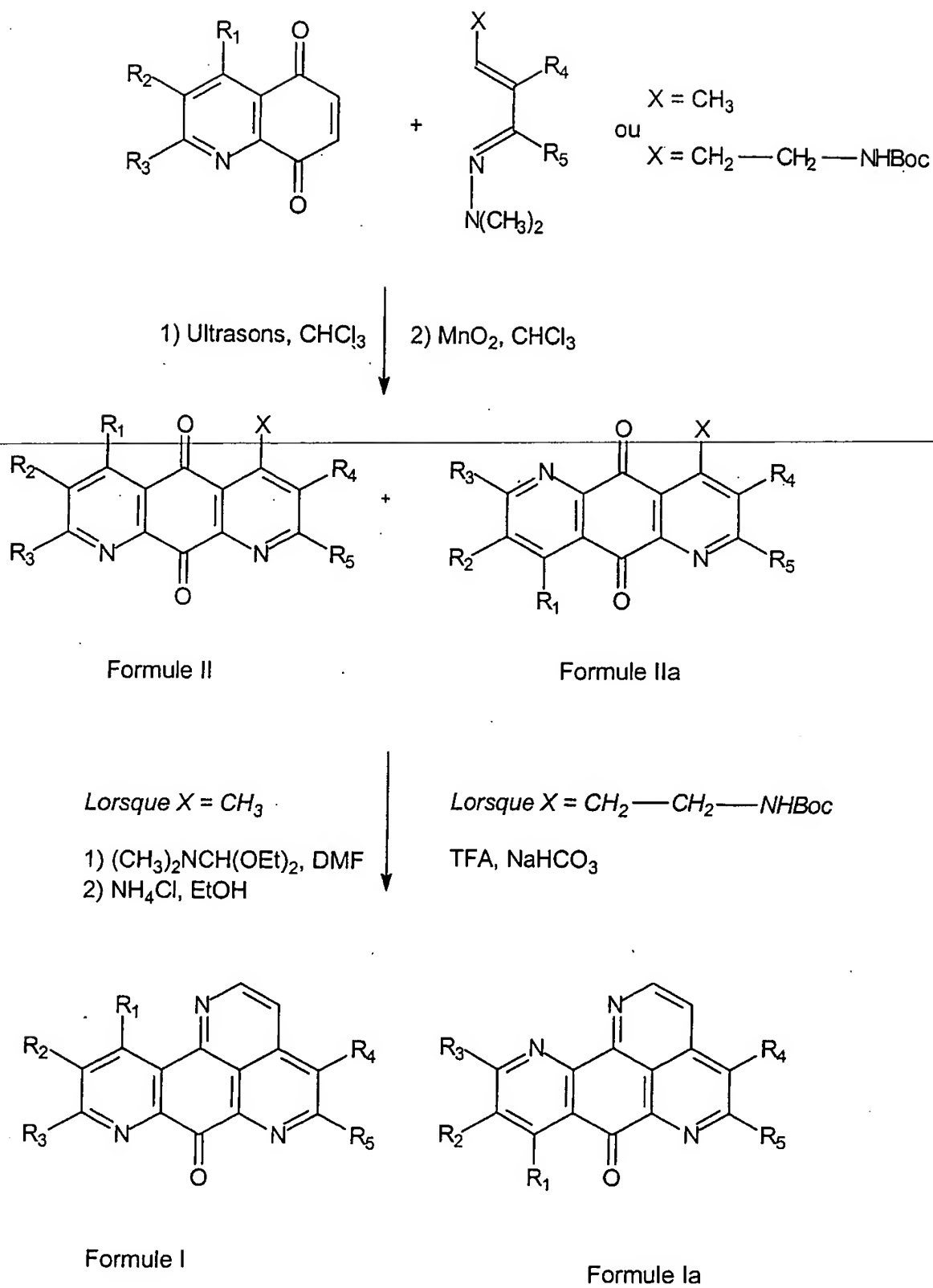
La présente invention a plus particulièrement pour objet les composés choisis parmi les composés de formule (I) et de formule (Ia) dans lesquels R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> sont choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hydroxy, -OR, les groupes nitro, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOR ou R est un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

10 Les "sels d'addition avec des acides pharmaceutiquement acceptables" désignent les sels qui donnent les propriétés biologiques des bases libres, sans avoir d'effet indésirable. Ces sels peuvent être notamment ceux formés avec des acides minéraux, tels que l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide sulfurique, l'acide nitrique, l'acide phosphorique; des sels métalliques acides, tels que l'orthophosphate disodique et  
15 le sulfate monopotassique, et des acides organiques.

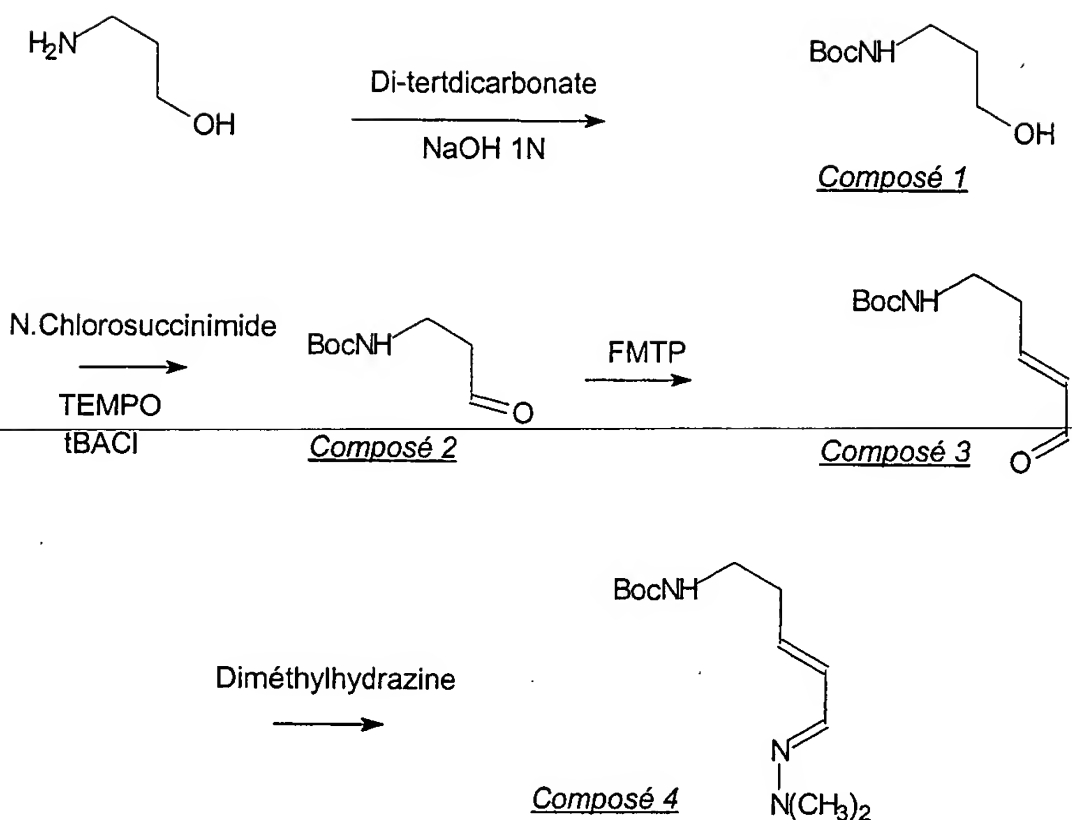
De manière générale, les composés de formule (I) et (Ia) sont obtenus selon le schéma réactionnel général I, présenté ci-après. Selon ce schéma, les composés de formule I et Ia peuvent être préparés par une réaction d'hétéro Diels-Alder entre une  
20 quinoléine-5,8 dione substituée et un aza-diène substitué, suivi de la deshydrogénation du composé dihydrogéné intermédiaire. Les composés de formule (I) et (Ia) peuvent également être préparés plus directement à partir d'autres composés de formule (I) et (Ia) déjà synthétisés :

Schéma I



Un exemple d'aza-diène substitué peut-être préparé selon le schéma II.

Schéma II



TEMPO = tétraméthyl-1-pipéridinyloxy, radical libre  
 tBACl = chlorure de tétrabutyl ammonium  
 FMTP = formylméthylènetriphénylphosphorane

5

Les exemples suivants illustrent la préparation des composés de formules (I) et (Ia).

### A - Préparation de l'aza-diène selon le schéma II

#### 10 A-1 - Synthèse du N-BOC-1-amino-2-hydroxy-propane (Composé 1)

A une solution de 2ml (27 mmol) de 3-amino-1-propanol dans un mélange de 60 ml de dioxanne, 30 ml d'eau et 30 ml de NaOH 1N, on ajoute à 0 °C, 4,2 g (29,7 mmol) de di-*tert*-butyldicarbonate. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante une nuit puis il est acidifié à pH 1 à l'aide d'HCl

concentré. Après plusieurs extractions (3 fois 50 ml) par l'acétate d'éthyle (AcOEt), les phases organiques sont séchées sur  $\text{MgSO}_4$  puis concentrées à l'évaporateur rotatif pour donner 4 g de produit attendu sous forme d'une huile jaune:

- Rendement : 85 %.

- 5 •  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 1,25 (s, 9H) ; 2,50 (m, 2H) ; 3,05 (m, 2H) ; 3,45 (m, 2H) ; 5,40 (s large, 1H).

#### A-2 - Synthèse du N-BOC-3-amino-propanal (Composé 2)

18 g (103 mmol) de composé 1, 1,62 g (10,4 mmol) de TEMPO (tétraméthyl-1-pipéridinyloxy, radical libre), 2,9 g (10,45 mmol) de chlorure de tétrabutyl ammonium et 21 g (75,5 mmol) de N-chlorosuccinimide sont mis en suspension dans 351 ml de  $\text{NaHCO}_3$  /  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,5 N / 0,05 N) et 351 ml de  $\text{HCCl}_3$ . Le milieu réactionnel est  
10  
15 fortement agité pendant 2 heures. La phase organique est décantée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis concentrée à l'évaporateur rotatif pour donner l'aldéhyde attendue sous forme d'huile orange clair.

- Rendement : 100 %.

- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 1,35 (s, 9H) ; 2,44 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz) ; 3,21 (m, 2H) ; 4,90 (s large, 1H) ; 6,04 (dd, 1H,  $J = 8$  et 15,6 Hz) ; 6,74 (td, 1H,  $J = 6,8$  et 15,6 Hz) ; 9,39 (d, 1H,  $J = 8$  Hz).

#### A-3 - Synthèse du N-BOC-5-amino-2-penten-1-al (Composé 3)

11 g (66,7 mmol) de composé 2 et 24,3 g (80 mmol) de formylméthylènetriphénylphosphorane (FMTP) sont solubilisés dans 350 ml de benzène puis le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 9 heures. Après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, le résidu est filtré une première fois sur silice [ $(\text{CHCl}_3$  / heptane 1 : 1) puis  $\text{CHCl}_3$ ] pour éliminer la triphénylphosphine. Une deuxième filtration sur silice (AcOEt / heptane 8 : 2) permet d'obtenir 3,88 g de composé 3 sous forme d'une huile jaune-orange.

- Rendement : 29 %

- 30 •  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 1,47 (s, 9H) ; 2,60 (m, 2H) ; 3,38 (m, 2H), 4,82 (s large, 1H) ; 6,18 (dd, 1H) ; 6,88 (td, 1H) ; 9,55 (d, 1H).

#### A-4 - Synthèse de la diméthylhydrazone du N-BOC-5-amino-2-penten-1-al (Composé 4)

A 1,47 ml (19,5 mmol) de diméthylhydrazine et 8 gouttes d'acide acétique dans 30 ml d'éther sont ajoutés à 0 °C 3,88 g (19,5 mmol) de composé 3. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation 10 min, la phase organique est décantée, lavée par de l' HCl 1N puis par une solution saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO<sub>4</sub> et évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, 4,4 g d'hydrazone (composé 4) sont obtenus sous forme d'huile jaune-orangé.

- Rendement : 94 %

- <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) : 2,30 (s, 9H) ; 2,3 (m, 2H) ; 2,82 (m, 2H), 4,52 (s large, 1H) ; 5,70 (td, 1H, J = 6,8 et 15,6 Hz) ; 6,22 (ddd, 1H, J = 0,8 et 8,8 et 15,6 Hz) ; 6,96 (d, 1H, J = 8,8 Hz).

- <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) : 28,15 ; 33,05 ; 39,58 ; 42,51 ; 78,77 ; 130,84 ; 130,95 ; 135,54 ; 155,68.

### B - Préparation des composés de formule II et IIa

15

#### **B-1 - Synthèse de la 4-méthylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione (intermédiaire I-1b) et de la 4-méthylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione (intermédiaire II-1b)**

Un mélange de 0,5 g (3,14 mmol) de quinoline-5,8-dione, 0,35 g (3,14 mmol) de diméthylhydrazone du crotonaldéhyde et 0,45 ml (4,76 mmol) d'anhydride acétique dans 20 ml de CHCl<sub>3</sub> sont traités dans un bain à ultrasons pendant 1 heure. Après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, le milieu réactionnel est filtré sur silice (CHCl<sub>3</sub>) pour donner 0,428 g de mélange des deux isomères I-1a et II-1a sous forme de poudre violette. Cette poudre et 1,6 g (18,4 mmol) de MnO<sub>2</sub> sont mis en suspension dans 20 ml de CHCl<sub>3</sub> et le mélange est porté à reflux pendant 2 heures. Après filtration sur célite, le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif puis purifié par flash-chromatographie sur colonne de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98 : 2) pour donner :

25

#### **Intermédiaire (I-1b) : la 4-méthylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione :**

- 40 mg (Rendement : 6 %) sous forme de poudre marron.

- Point de fusion : 220 °C.

30

- <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) : 2,91 (s, 3H) ; 7,54 (d, 1H, J = 4,8 Hz) ; 7,75 (dd, 1H, J = 4 et 7,6 Hz) ; 8,67 (dd, 1H, J = 2 et 7,6 Hz) ; 8,91 (d, 1H, J = 4,8 Hz) ; 9,12 (dd, 1H, J = 2 et 4 Hz).

- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 22,75 ; 127,93 ; 128,04 ; 129,32 ; 131,50 ; 135,50 ; 148,73 ; 149,26 ; 152,11 ; 153,68 ; 155,47 ; 181,46 ; 182,87.

- IR ( $\text{CHCl}_3$ ) : 1689.

**Intermédiaire (II-1b) : la 4-méthylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione**

- 160 mg (Rendement : 23 %) sous forme d'une poudre marron.
- Point de fusion : 270 °C .
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 2,94 (s, 3H) ; 7,52 (d, 1H, J = 4,8 Hz) ; 7,76 (dd, 1H, J = 4,8 et 8,4 Hz) ; 8,59 (dd, 1H, J = 2 et 8,4 Hz) ; 8,92 (d, 1H, J = 4,8 Hz) ; 9,11 (dd, 1H, J = 2 et 4,8 Hz).
- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 22,81 ; 128,30 ; 128,39 ; 130,84 ; 131,55 ; 135,52 ; 147,90 ; 149,95 ; 151,74 ; 153,94 ; 155,35 ; 180,42 ; 184,02. IR ( $\text{HCCl}_3$ ) 1672 ; 1700.

**B-2 - Synthèse de la 9-méthoxy-4-méthylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione**

(Intermédiaire I-2b) et de la 6-méthoxy-4-méthylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione (intermédiaire II-2b) :

Un mélange de 0,5 g (2,8 mmol) de 4-méthoxy-quinoline-5,8-dione, 0,32 g (2,87 mmol) de diméthylhydrazone du crotonaldéhyde et 0,4 ml (4,23 mmol) d'anhydride acétique dans 8 ml de  $\text{CHCl}_3$  sont portés à reflux pendant 1 heure. Après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, le milieu réactionnel est filtré sur silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98 : 2) pour donner 0,48 g de mélange des deux isomères I-2a et II-2a sous forme de poudre violette. Cette poudre et 2,3 g (26,45 mmol) de  $\text{MnO}_2$  sont mis en suspension dans 26 ml de  $\text{CHCl}_3$  et le mélange est porté à reflux pendant 2 heures. Après filtration sur célite, le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif puis purifié par flash-chromatographie sur colonne de silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98 : 2) pour donner :

**Intermédiaire I-2b : la 9-méthoxy-4-méthylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione:**

- 57 mg (Rendement : 8 %) sous forme de poudre rouge.
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 2,84 (s, 3H) ; 4,06 (s, 3H) ; 7,18(d, 1H, J = 6 Hz) ; 7,46 (d, 1H, J = 4,4 Hz) ; 8,87 (d, 1H, J = 6 Hz) ; 8,87 (d, 1H, J = 4,4 Hz).

**Intermédiaire II-2b : la 6-méthoxy-4-méthylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione :**

- 293 mg (Rendement : 40 %) sous forme d'une poudre orange.
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 2,80 (s, 3H) ; 4,05 (s, 3H) ; 7,2 (d, 1H, J = 6 Hz) ; 7,48 (d, 1H, J = 4,8 Hz) ; 8,85 (d, 1H, J = 6 Hz) ; 8,88 (d, 1H, J = 4,8 Hz).

- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 21,75 ; 43,41 ; 112,74 ; 119,72 ; 130,93 ; 131,04 ; 148,32 ; 149,22 ; 150,26 ; 151,60 ; 152,80 ; 155,11 ; 181,44 ; 184,53.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ) : 1675 ; 1700.

5 **B-3 - Synthèse de la 9-nitro-4-méthylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione**  
**(Intermédiaire I-5b) et de 6-nitro-4-méthylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione**  
**(intermédiaire II-5b) :**

- Un mélange de 0,8 g (3,92 mmol) de 4-nitro-quinoline-5,8-dione, 0,65 g (5,8 mmol) de diméthylhydrazone du crotonaldéhyde et 0,55 ml (5,8 mmol) d'anhydride
- 10 acétique dans 10,5 ml de  $\text{CHCl}_3$  sont traités dans un bain à ultrasons 30 min. Après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, le milieu réactionnel est filtré sur silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98 : 2) pour donner 0,7 g de mélange des deux isomères I-5a et II-5a
- 
- sous forme de poudre violette. Cette poudre et 2,9 g (33,4 mmol) de  $\text{MnO}_2$  sont mis en suspension dans 29 ml de  $\text{CHCl}_3$  et le mélange est porté à reflux pendant 2 heures.
- 15 Après filtration sur célite, le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif puis purifié par flash-chromatographie sur colonne de silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98 : 2) pour donner :

**Intermédiaire I-5b : la 9-nitro-4-méthylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione**

- 110 mg (Rendement : 11 %) sous forme de poudre.
- 20 •  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 2,98 (s, 3H) ; 7,19 (d, 1H,  $J = 5,6$  Hz) ; 7,54 (d, 1H,  $J = 4,8$  Hz) ; 8,79 (d, 1H,  $J = 5,6$  Hz) ; 8,94 (d, 1H,  $J = 4,8$  Hz).
- IR ( $\text{HCCl}_3$ ) : 1703.

**Intermédiaire II-5b : la 6-nitro-4-méthylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione**

- 165 mg (Rendement : 16 %) sous forme d'une poudre jaune-marron.
- 25 •  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 2,85 (s, 3H) ; 7,6 (d, 1H,  $J = 4,8$  Hz) ; 7,74 (d, 1H,  $J = 4,8$  Hz) ; 8,99 (d, 1H,  $J = 4,8$  Hz) ; 9,33 (d, 1H,  $J = 4,8$  Hz).

**B-4 - Synthèse de la 6-diméthylamino-4-méthylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione**  
**(Intermédiaire II-3b)**

- 30 150 mg (0,558 mmol) de tricycle nitré II-5a (préparation chapitre B-3) et 0,4 ml (1,95 mmol) de N,N-diméthylformamide diéthyl acétal sont solubilisés dans 2,1 ml de DMF et le milieu réactionnel est chauffé à 130 °C pendant 1 heure. Après évaporation

du solvant à la pompe à vide, on obtient 140 mg de composé intermédiaire **II-3b** qui sera utilisé tel quel dans l'étape suivante.

- Rendement : 94 %.

- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 2,77 (s, 3H) ; 3,05 (s, 6H) ; 6,89 (d, 1H,  $J = 6$  Hz) ; 7,39 (d, 1H,  $J = 4,8$  Hz) ; 8,42 (d, 1H,  $J = 6$  Hz) ; 8,74 (d, 1H,  $J = 4,8$  Hz).

**B-5 - Synthèse de la 9-chloro-4-(N-BOC-1-aminoéthane)-5,10-dihydropyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione (Intermédiaire I-7b) et de la 6-chloro-4-(N-BOC-1-aminoéthane)-5,10-dihydropyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione (intermédiaire II-7b) :**

Un mélange de 0,6 g (3,1 mmol) de 4-chloro-quinoline-5,8-dione, 0,75 g (3,1 mmol) de diméthylhydrazone 4 et 0,45 ml (4,76 mmol) d'anhydride acétique dans 8,5 ml de  $\text{CHCl}_3$  sont traités dans un bain à ultrasons pendant 30 min. Après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, le milieu réactionnel est additionné de 2,7 g (31,1 mmol) de  $\text{MnO}_2$  et de 22 ml de  $\text{CHCl}_3$  et le mélange est porté à reflux pendant 2 heures. Après filtration sur célite, le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif puis purifié par flash-chromatographie sur colonne de silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH 99 : 1) pour donner :

**Intermédiaire I-7b : 9-chloro-4-(N-BOC-1-aminoéthane)-5,10-dihydropyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione**

- 70 mg (Rendement : 6 %) sous forme de poudre marron.
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 1,35 (s, 9H) ; 3,45-3,52 (m, 4H) ; 4,86 (s large, 1H) ; 7,56 (d, 1H,  $J = 4,0$  Hz) ; 7,74 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz) ; 8,90 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz) ; 8,94 (d, 1H,  $J = 4$  Hz) ;
- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 28,37 ; 35,32 ; 40,30 ; 79,47 ; 126,84 ; 128,04 ; 130,88 ; 131,17 ; 145,78 ; 150,34 ; 150,98 ; 152,29 ; 154,05 ; 154,36 ; 155,88 ; 179,76 ; 182,32.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ) : 1695

**Intermédiaire II-7b : 6-chloro-4-(N-BOC-1-aminoéthane)-5,10-dihydropyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione**

- 200 mg (Rendement : 17 %) sous forme d'une poudre marron.
- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 28,24 ; 34,96 ; 40,33 ; 79,47 ; 128,46 ; 130,15 ; 131,06 ; 131,59 ; 145,20 ; 148,76 ; 149,71 ; 151,74 ; 153,88 ; 153,92 ; 155,84 ; 179,76 ; 183,20.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ) : 1705.



**B-6 - Synthèse de la 3-méthoxy-4-méthylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione (I-8b) et de la 3-méthoxy-4-méthylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione (II-8b)**

Un mélange de 1 g (6,28 mmol) de quinoline-5,8-dione, 1,78 g (12,57 mmol) de la diméthylhydrazone du 2-méthoxy-2-buténal dans 25 ml de  $\text{CHCl}_3$  sont agités à température ambiante pendant 5 heures. Après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, le milieu réactionnel est filtré sur silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95 : 5) pour donner 1,55 g de mélange des deux isomères I-8a et II-8a sous forme de poudre violette. Cette poudre et 1 g (11,5 mmol) de  $\text{MnO}_2$  sont mis en suspension dans 30 ml de  $\text{CHCl}_3$  et le mélange est agité à température ambiante pendant 1 heure. Après filtration sur célite, le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif puis purifié par flash-chromatographie sur colonne de silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  99 : 1) pour donner :

---

**Intermédiaire I-8b : la 3-méthoxy-4-méthylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione**

- 110 mg (Rendement : 7 %) sous forme d'une poudre marron.
- Point de fusion : > 260 °C.
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 2,79 (s, 3H) ; 4,11 (s, 3H) ; 7,72 (dd, 1H, J = 4,8 et 8,1 Hz) ; 8,66 (s, 1H) ; 8,67 (dd, 1H, J = 8,1 et 1,9 Hz) ; 9,10 (dd, 1H, J = 4,8 et 1,9 Hz).
- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 13,03 ; 56,87 ; 127,88 ; 129,50 ; 129,95 ; 135,50 ; 136,64 ; 139,26 ; 142,56 ; 149,33 ; 155,11 ; 157,24 ; 180,63 ; 183,56.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ) : 1684.

**Intermédiaire II-8b : la 3-méthoxy-4-méthylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione**

- 190 mg (Rendement : 12 %) sous forme d'une poudre marron.
- Point de fusion : > 260 °C.
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 2,77 (s, 3H) ; 4,12 (s, 3H) ; 7,74 (dd, 1H, J = 4,6 et 8,0 Hz) ; 7,60 (dd, 1H, J = 8,0 et 1,6 Hz) ; 8,68 (s, 1H) ; 9,12 (dd, 1H, J = 4,6 et 1,6 Hz).
- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 12,98 ; 56,93 ; 127,99 ; 129,06 ; 131,27 ; 135,53 ; 136,84 ; 138,81 ; 143,27 ; 148,16 ; 155,20 ; 157,16 ; 179,69 ; 184,59.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ) : 1670 ; 1692.

**EXEMPLE 1 :****7H-pyrido[4,3,2-de][1,10]phénanthroline-7-one (CRL 8293)**

0,63 g (2,81 mmol) de composé **I-1b** et 1,7 ml (9,84 mmol) de diméthylformamide diéthylacétal dans 4,5 ml de DMF sont portés à 120°C, sous azote, pendant 1 heure. Après évaporation du solvant à la pompe à vide, 3,5 g (65 mmol) de NH<sub>4</sub>Cl et 60 ml d'éthanol absolu sont ajoutés. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30 min. Après évaporation de l'éthanol à l'évaporateur rotatif, le résidu est additionné de 50 ml d'eau et extrait au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 fois 50 ml). Après séchage des phases organiques sur MgSO<sub>4</sub> et évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, 0,6 g de tétracycle sont obtenus sous forme d'une poudre verdâtre.

- Rendement : 90 %.

- Point de fusion : 240 °C.

- <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) : 7,68 (dd, 1H, J = 4,4 et 8 Hz) ; 7,87 (d, 1H, J = 5,6 Hz) ; 8,02 (d, 1H, J = 5,2 Hz) ; 8,77 (dd, 1H, J = 1,6 et 8 Hz) ; 9,11 (d, 1H, J = 5,2 Hz) ; 9,16 (dd, 1H, J = 1,6 et 4,4 Hz) ; 9,19 (d, 1H, J = 5,6 Hz).

- <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) : 120,95 ; 124,40 ; 126,14 ; 129,32 ; 136,78 ; 139,09 ; 147,45 ; 148,58 ; 148,82 ; 148,96 ; 150,66 ; 152,00 ; 155,73 ; 181,96.

**EXEMPLE 2 :****7H-pyrido[4,3,2-de][1,7]phénanthroline-7-one (CRL 8294)**

0,87 g (3,88 mmol) du composé **II-1b** et 2,5 ml (14,7 mmol) de diméthylformamide diéthylacétal dans 6,1 ml de DMF sont portés à 120 °C, sous azote, pendant 1 heure. Après évaporation du solvant à la pompe à vide, 4,9 g (91 mmol) de NH<sub>4</sub>Cl et 780 ml d'éthanol absolu sont ajoutés. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30 min. Après évaporation de l'éthanol à l'évaporateur rotatif, le résidu est additionné de 50 ml d'eau et extrait au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 fois 50 ml). Après séchage des phases organiques sur MgSO<sub>4</sub> et évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, 0,72 g de tétracycle sont obtenus sous forme d'une poudre jaune.

- Rendement : 80 %.

- <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) : 7,76 (dd, 1H, J = 4,4 et 8 Hz) ; 7,80 (d, 1H, J = 5,2 Hz) ; 7,99 (d, 1H, J = 5,6 Hz) ; 8,93 (d, 1H, J = 5,6 Hz) ; 9,05 (dd, 1H, J = 1,6 et 4,4 Hz) ; 9,17 (dd, 1H, J = 1,6 et 8 Hz) ; 9,19 (d, 1H, J = 5,2 Hz).

- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 119,39 ; 120,01 ; 123,85 ; 128,15 ; 132,87 ; 133,80 ; 138,65 ; 147,54 ; 147,74 ; 148,93 ; 149,49 ; 149,99 ; 152,97 ; 180,73.

### **EXEMPLE 3 :**

#### **5 8-méthoxy-7H-pyrido[4,3,2-de][1,10]phénanthroline-7-one (CRL 8363)**

0,74 g (2,92 mmol) du composé I-2b et 2 ml (11,8 mmol) de diméthylformamide diéthylacétal dans 5,2 ml de DMF sont portés à 120 °C, sous azote, pendant 1 heure. Après évaporation du solvant à la pompe à vide, 4,5 g (83,6 mmol) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et 67 ml d'éthanol absolu sont ajoutés. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30 min. Après évaporation de l'éthanol à l'évaporateur rotatif, le résidu est additionné de 50 ml d'eau et extrait au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 fois 50 ml). Après séchage des phases organiques sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, le résidu est purifié par flash-chromatographie sur colonne de silice ( $\text{CHCl}_3$  /  $\text{MeOH}$  98 : 2) pour donner 0,28 g de tétracycle sous forme d'une poudre orange.

- Rendement : 37%.
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 4,20 (s, 3H) ; 7,13 (d, 1H,  $J = 5,6$  Hz) ; 7,82 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz) ; 7,94 (d, 1H,  $J = 6$  Hz) ; 8,92 (d, 1H,  $J = 5,6$  Hz) ; 9,07 (d, 1H,  $J = 6$  Hz) ; 9,13 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz) ; 9,19 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz).
- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 56,77 ; 109,26 ; 119,70 ; 120,47 ; 123,09 ; 138,50 ; 147,85 ; 148,25 ; 148,69 ; 150,66 ; 154,08 ; 155,68 ; 167,54 ; 180,40.

### **EXEMPLE 4 :**

#### **25 11-méthoxy-7H-pyrido[4,3,2-de][1,7]phénanthroline-7-one (CRL 8364)**

1,14 g (4,48 mmoles) de composé II-2b et 3 ml (14,7 mmol) de diméthylformamide diéthylacétal dans 8 ml de DMF sont portés à 120 °C, sous azote, pendant 1 heure. Après évaporation du solvant à la pompe à vide, 4,5 g (83,6 mmol) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et 67 ml d'éthanol absolu sont ajoutés. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30 min. Après évaporation de l'éthanol à l'évaporateur rotatif, le résidu est additionné de 50 ml d'eau et extrait au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 fois 50 ml). Après séchage des phases organiques sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, le résidu

est purifié par flash-chromatographie sur colonne de silice ( $\text{CHCl}_3$  /  $\text{MeOH}$  98 : 2) pour donner 0,59 g de tétracycle sous forme d'une poudre jaune.

- Rendement : 50%.

- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 4,15 (s, 3H) ; 7,26 (d, 1H,  $J = 6$  Hz) ; 7,70 (d, 1H,  $J = 6$  Hz) ; 7,96 (d, 1H,  $J = 5,6$  Hz) ; 8,85 (d, 1H,  $J = 6$  Hz) ; 8,97 (d, 1H,  $J = 6$  Hz) ; 9,15 (d, 1H,  $J = 5,6$  Hz).

- $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 57,05 ; 111,33 ; 118,72 ; 119,61 ; 122,12 ; 124,29 ; 138,56 ; 146,71 ; 147,10 ; 148,69 ; 149,81 ; 150,96 ; 153,13 ; 165,83 ; 180,82.

#### 10 **EXEMPLE 5 :**

##### **11-(diméthylamino)-7H-pyrido[4,3,2-de][1,7]phénanthroline-7-one (CRL8367)**

80 mg (0,3 mmol) de tricycle **II-3b** et 0,21 ml (1,05 mmol) de diméthylformamide diéthylacétal dans 1,2 ml de DMF sont portés à 120 °C, sous azote, pendant 1 heure.

15 Après évaporation du solvant à la pompe à vide, 0,5 g (9,3 mmol) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et 80 ml d'éthanol absolu sont ajoutés. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 40 min. Après évaporation de l'éthanol à l'évaporateur rotatif, le résidu est additionné de 5 ml d'eau et extrait au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 fois 5 ml). Après séchage des phases organiques sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, le tétracycle est obtenu sous

20 forme d'une poudre rouge.

- Rendement : 100 %

- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 3,00 (s, 6H) ; 7,09 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz) ; 7,57 (d, 1H,  $J = 5,6$  Hz) ; 7,90 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz) ; 8,54 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz) ; 8,89 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz) ; 9,11 (d, 1H,  $J = 5,6$  Hz).

25

#### **EXEMPLE 6 :**

##### **11-hydroxy-7H-pyrido[4,3,2-de][1,7]phénanthroline-7-one (CRL 8388)**

50 mg (0,126 mmol) de tricycle **II-7b** sont mis en solution dans 0,5 ml de TFA, puis

30 le milieu réactionnel est agité 24 heures. Le TFA est évaporé à l'évaporateur rotatif puis on ajoute une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  jusqu'à obtention de pH 9-10. Le milieu est extrait au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 fois 3 ml). Après séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, on obtient 20 mg de tétracycle sous forme de poudre jaune.

- Rendement : 62%.

- Point de fusion : > 260 °C.
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7,20 (d, 1H, J = 5,6 Hz) ; 7,83 (d, 1H, J = 6 Hz) ; 8,00 (d, 1H, J = 6 Hz) ; 8,72 (d, 1H, J = 6 Hz) ; 8,76 (d, 1H, J = 6 Hz) ; 9,24 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 14,65 (s, 1H).
- 5 •  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{DMSO}, d_6$ ) : 116,22 ; 116,35 ; 118,61 ; 120,24 ; 124,06 ; 138,09 ; 143,61 ; 148,04 ; 148,99 ; 149,41 ; 152,61 ; 153,01 ; 165,80 ; 179,55.

#### **EXEMPLE 7 :**

##### **8-chloro-7H-pyrido[4,3,2-de][1,10]phénanthroline-7-one (CRL 8396)**

10

260 mg (0,67 mmol) de tricycle **I-7b** sont mis en solution dans 2,6 ml de TFA, puis le milieu réactionnel est agité 64 heures. Le TFA est évaporé à l'évaporateur rotatif puis on ajoute 200 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95 : 5 et une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  jusqu'à obtention de pH 10. On récupère la phase organique et on la lave à l'eau. Après

15 séchage sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, on obtient 40 mg de tétracycle sous forme d'une poudre marron que l'on lave à l'éther.

- Rendement : 28%.
- Point de fusion : > 260 °C.
- $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7,68 (d, 1H, J = 5,2 Hz) ; 7,89 (d, 1H, J = 5,5 Hz) ; 8,01 (d, 1H, J = 5,5 Hz) ; 8,96 (d, 1H, J = 5,2 Hz) ; 9,14 (d, 1H, J = 5,5 Hz) ; 9,19 (d, 1H, J = 5,5 Hz).
- 20 •  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{DMSO}, d_6$ ) : 119,87 ; 120,88 ; 123,61 ; 126,31 ; 129,01 ; 138,56 ; 146,87 ; 147,37 ; 148,46 ; 148,94 ; 149,76 ; 153,85 ; 153,96 ; 179,87.

#### **EXEMPLE 8 :**

##### **4-méthoxy-7H-pyrido[4,3,2-de][1,10]phénanthroline-7-one (CRL 8400)**

25

0,1 g (0,39 mmol) de tricycle **I-8b** et 0,27 ml (1,37 mmol) de diméthylformamide diéthylacétal dans 0,7 ml de DMF sont portés à 120 °C, sous azote, pendant 1 heure. Après évaporation du solvant à la pompe à vide, 0,6 g (11,7 mmol) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et 90 ml

30 d'éthanol absolu sont ajoutés. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30 min. Après évaporation de l'éthanol à l'évaporateur rotatif, le résidu est additionné de 10 ml d'eau et extrait au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 fois 10 ml). Après séchage des phases organiques sur  $\text{MgSO}_4$ , évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif et purification par filtration sur

silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 95: 5) 85 mg de tétracycle sont obtenus sous forme d'une poudre marron.

- Rendement : 83%.
- Point de fusion : > 260 °C.
- 5 • <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) : 4,27 (s, 3H) ; 7,65 (dd, 1H, J = 4,8 et 8 Hz) ; 8,15 (d, 1H, J = 6 Hz) ; 8,70 (s, 1H) ; 8,78 (dd, 1H, J = 8 et 1,9 Hz) ; 9,10 (d, 1H, J = 6 Hz) ; 9,13 (dd, 1H, J = 1,9 et 4,8 Hz).
- <sup>13</sup>C RMN (DMSO, d<sub>6</sub>) : 56,97 ; 115,63 ; 120,81 ; 125,52 ; 129,02 ; 129,16 ; 130,22 ; 136,24 ; 139,81 ; 147,37 ; 149,31 ; 151,65 ; 153,07 ; 154,81 ; 180,34.
- 10 • IR (CHCl<sub>3</sub>) : 1674.

---

#### EXEMPLE 9 :

##### 4-méthoxy-7*H*-pyrido[4,3,2-*de*][1,7]phénanthroline-7-one (CRL 8401)

- 15 0,1 g (0,39 mmol) de tricycle II-8b et 0,27 ml (1,37 mmol) de diméthylformamide diéthylacétal dans 0,7 ml de DMF sont portés à 120 °C, sous azote, pendant 1 heure. Après évaporation du solvant à la pompe à vide, 0,6 g (11,7 mmol) de NH<sub>4</sub>Cl et 90 ml d'éthanol absolu sont ajoutés. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 30 min. Après évaporation de l'éthanol à l'évaporateur rotatif, le résidu est additionné de 10 ml
- 20 d'eau et extrait au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 fois 10 ml). Après séchage des phases organiques sur MgSO<sub>4</sub>, évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif et purification par filtration sur silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 98 : 2) 60 mg de tétracycle sont obtenus sous forme d'une poudre jaune-marron.
- Rendement : 59 %.
  - 25 • Point de fusion : > 260 °C.
  - <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) : 4,27 (s, 3H) ; 7,74 (dd, 1H, J = 4,4 et 8,1 Hz) ; 8,08 (d, 1H, J = 5,6 Hz) ; 8,72 (s, 1H) ; 8,93 (d, 1H, J = 5,6 Hz) ; 9,05 (dd, 1H, J = 1,9 et 4,4 Hz) ; 9,19 (dd, 1H, J = 1,9 et 8,1 Hz).
  - <sup>13</sup>C RMN (DMSO, d<sub>6</sub>) : 57,03 ; 115,16 ; 119,70 ; 127,69 ; 129,48 ; 130,15 ; 132,86 ;
  - 30 133,74 ; 140,82 ; 146,80 ; 147,98 ; 148,63 ; 152,81 ; 152,98 ; 179,84.
  - IR (CHCl<sub>3</sub>) : 1679.

Les résultats des essais pharmacologiques *in vitro* et *in vivo*, présentés ci-après, mettent en évidence les propriétés cytotoxiques des composés de formule (I) et (Ia), ainsi que les doses maximales tolérées (DMT).

## 5           1 - Activité cytotoxique sur des lignées cellulaires tumorales en culture (test MTT)

L'influence des composés de formule (I) et (Ia) sur les cellules tumorales a été évaluée à l'aide du test colorimétrique MTT (T. Mosman. J. Immunol Methods 1983 ; 65 : 55-63, J. Carmichael *et al.* Cancer Res. 1987 ; 47 : 936-942).

10       Le principe du test MTT est basé sur la réduction mitochondriale par les cellules vivantes métaboliquement actives du produit MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényltétrazolium) de couleur jaune en un produit de couleur bleue, le formazan. La quantité de formazan ainsi obtenue est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes présentes dans le ou les puits de culture. Cette quantité de  
15       formazan est mesurée par spectrophotométrie.

Les lignées cellulaires sont maintenues en culture monocouche à 37° C dans des boîtes de culture à bouchon fermé contenant du milieu de base MEM 25 MM HEPES (Minimum Essential Medium). Ce milieu est bien adapté à la croissance d'une gamme de cellules variées diploïdes ou primaires de mammifères. Ce milieu est ensuite  
20       additionnée :

- d'une quantité de 5% de SVF (Sérum de Veau Foetal) décomplémenté à 56° C pendant 1 heure,

- de 0,6 mg/ml de L-glutamine,
- de 200 IU/ml de pénicilline,
- 25       - de 200 µg/ml de streptomycine,
- de 0,1 mg/ml de gentamicine.

Les 12 lignées cellulaires cancéreuses humaines qui ont été utilisées ont été obtenues auprès de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA). Ces 12 lignées cellulaires sont :

- 30       - U-373MG (code ATCC : HTB-17) et U-87MG (code ATCC : HTB-14) qui sont deux glioblastomes,
- SW1088 (code ATCC : HTB-12) qui est un astrocytome,
- A549 (code ATCC : CCL-185) et A-427 (code ATCC : HTB-53) qui sont deux cancers du poumon non-à-petites-cellules,

- HCT-15 (code ATCC : CCL-225) et LoVo (code ATCC : CCL-229) qui sont deux cancers colorectaux,
- T-47D (code ATCC : HTB-133) et MCF7 (code ATCC : HTB-22) qui sont deux cancers du sein,
- 5 - J82 (code ATCC : HTB-1) et T24 (code ATCC : HTB-4) qui sont deux cancers de la vessie,
- PC-3 (code ATCC : CRL-1435) qui est un cancer de la prostate.

Au plan expérimental : 100 µl d'une suspension cellulaire contenant 20 000 à 50 000  
 10 (selon le type cellulaire utilisé) cellules/ml de milieu de culture sontensemencés en plaques multi-puits de 96 puits à fond plat et sont mis à incuber à 37°C, sous atmosphère comprenant 5% de CO<sub>2</sub> et 70% d'humidité. Au bout de 24 heures d'incubation, le milieu de culture est remplacé par 100 µl de milieu frais contenant soit les  
 différents composés à tester à des concentrations variant de 10<sup>-5</sup> à 10<sup>-10</sup> M soit le  
 15 solvant ayant servi à la mise en solution des produits à tester (condition contrôle). Après 72 heures d'incubation dans les conditions précédentes, le milieu de culture est remplacé par 100 µl d'une solution jaunâtre de MTT dissous à raison de 1 mg/ml dans du RPMI 1640. Les microplaques sont remises à incuber pendant 3 heures à 37°C puis centrifugées pendant 10 minutes à 400 g. La solution jaunâtre de MTT est éliminée et les  
 20 cristaux de formazan bleu formés au niveau cellulaire sont dissous dans 100 µl de DMSO. Les microplaques sont ensuite mises sous agitation pendant 5 minutes. L'intensité de la coloration bleue résultant donc de la transformation du produit MTT jaune en formazan bleu par les cellules encore vivantes au terme de l'expérience est quantifiée par spectrophotométrie à l'aide d'un appareil de type *DYNATECH*  
 25 *IMMUNOASSAY SYSTEM* aux longueurs d'onde de 570 nm et 630 nm correspondant respectivement aux longueurs d'ondes d'absorbance maximale du formazan et au bruit de fond. Un logiciel intégré au spectrophotomètre calcule les valeurs moyennes de densité optique ainsi que les valeurs de déviation standard (Dév. Std.) et d'erreur standard sur la moyenne (ESM).

30 L'activité inhibitrice de la croissance cellulaire des composés de formule (I) et (Ia) sur les différentes lignées cellulaires tumorales a été mesurée en comparaison avec celle du produit naturel. A titre d'exemple, les valeurs des concentrations encadrant les concentrations inhibitrices 50 % (CI 50) obtenues pour chaque composé sont présentées, dans le tableau I, ci-après :



TABLEAU I

LIGNEES CELLULAIRES	COMPOSES (concentration : mol.l <sup>-1</sup> )								
	CRL8293	CRL8294	CRL8363	CRL8364	CRL8367	CRL8388	CRL8396	CRL8400	CRL8401
U-87MG	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
U-373MG	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
SW1088	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
T24	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
J82	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]
HCT-15	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
LoVo	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]
MCF7	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
T-47D	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]
A549	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
A-427	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
PC-3	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	> 10 <sup>-5</sup>	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]

L'ensemble des composés étudiés présente une activité inhibitrice significative de la  
5 prolifération cellulaire des 12 lignées tumorales humaines : U-87MG, U-373MG, SW 1088, T24, J82, HCT-15, LoVo, MCF7, T-47D, A549, A-427 et PC-3 avec une CI 50 pouvant être comprise entre 10<sup>-5</sup> et 10<sup>-8</sup>M, selon les composés et les lignées tumorales testés.

## 2 - Détermination de la dose maximale tolérée (DMT)

L'évaluation de la dose maximale tolérée a été réalisée chez des souris B6D2F1/Jico âgées de 4 à 6 semaines. Les composés ont été administrés par voie intrapéritonéale à des doses croissantes s'échelonnant de 2,5 à 160 mg/kg. La valeur de la DMT (exprimée en mg/kg) est déterminée à partir de l'observation du taux de survie des animaux sur une période de 14 jours après une administration unique du produit considéré. L'évolution pondérale des animaux est également suivie pendant cette période. Lorsque que la valeur de la DMT est supérieure à 160 mg/kg, la valeur de la DMT est assimilée à 160 mg/kg par défaut.

Les résultats de l'estimation de la dose maximale tolérée (DMT) sont rassemblés dans le tableau II suivant :

**TABLEAU II**

Doses Maximales Tolérées

Composés CRL	DMT (mg/kg)
CRL8388 (Exemple 6)	10
CRL8293 (Exemple 1)	10
CRL8294 (Exemple 2)	10
CRL8363 (Exemple 3)	10
CRL8364 (Exemple 4)	5
CRL8367 (Exemple 5)	10
CRL8396 (Exemple 7)	20
CRL8400 (Exemple 8)	> 160
CRL8401 (Exemple 9)	> 160

Les produits de cette famille présentent soit une certaine toxicité directe ou peuvent en être dépourvu et être alors utilisés *in vivo* à des concentrations tissulaires élevées, donc à des posologies fortes.

## 3 - Activité antitumorale in vivo

Les essais ont été réalisés sur les modèles de :

- carcinome mammaire murin MXT hormono-insensible (MXT-HI),
- adénocarcinome mammaire murin MXT hormono-sensible (MXT-HS),
- lymphome L 1210.

Le modèle d'adénocarcinome mammaire murin MXT de Watson C. *et al.* (Cancer Res. 1977 ; 37 : 3344 – 48), greffé sur des souris B6D2F1/Jlco âgées de 4 à 6 semaines, est dérivé des canaux galactophores de glande mammaire. Initialement hormono-sensible (modèle MXT-HS), la tumeur différenciée évolue vers une tumeur  
 5 hormono-insensible indifférenciée (modèle MXT-HI). Les agents dont l'activité antitumorale a été démontrée sur le plan clinique prolongent la survie des animaux porteurs de tumeurs MXT-HI et de tumeurs MXT-HS. C'est le cas par exemple du cyclophosphamide, de l'étoposide ou encore de l'adriamycine.

Le modèle de lymphome L 1210 est un modèle de cellules leucémiques L 1210  
 10 d'origine murine greffées en sous cutané chez la souris. Elles donnent naissance, dans 100% des cas, à une tumeur solide sous cutanée (L1210 s.c.) à croissance rapide.

Lorsque la valeur de DMT d'un produit a été déterminée, son activité antitumorale *in vivo* a été caractérisée aux doses de DMT/2, DMT/4 et DMT/8 sur les modèles de  
 l'adénocarcinome mammaire d'origine murine MXT-HS , du carcinome mammaire murin  
 15 MXT-HI et sur le modèle du lymphome L 1210 sous-cutané.

Dans tous les exemples présentés ci-après, quelque soit le modèle, la condition contrôle est représentée par un lot de 9 ou 15 souris auxquelles est administré pendant 3 semaines consécutives et à raison de 3 administrations (lundi, mercredi et vendredi)  
 20 par semaine un volume de 0,2 ml de sérum physiologique contenant le solvant utilisé pour dissoudre les différents composés de formule (I) et (Ia) utilisés.

Au cours de ces essais, ont été déterminés soit la croissance tumorale soit le taux de survie des souris:

i)- La croissance tumorale a été estimée en mesurant deux fois par semaine  
 25 (lundi et vendredi) la surface des tumeurs MXT-HS, MXT-HI ou L 1210 greffées. Cette surface est calculée, en effectuant le produit de la valeur des deux plus grands axes perpendiculaires de la tumeur. La valeur de ces axes est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse.

ii)- le taux de survie des souris est calculé sous forme d'un rapport T/C ou :

$$T = \frac{\text{(Nombre de jours de survie de la souris médiane du lot de souris traitées)}}{\text{(Souris médiane traitée)} - \text{(Nombre de souris mortes dans les jours qui ont précédé celui de la souris médiane traitée)}} + \frac{\text{(Nombre de souris mortes le même jour que la souris médiane traitée)}}{\text{(Souris médiane traitée)} - \text{(Nombre de souris mortes dans les jours qui ont précédé celui de la souris médiane traitée)}}$$

$$C = \frac{\text{(Nombre de jours de survie de la souris médiane du lot de souris traitées)}}{\text{(Souris médiane traitée)} - \text{(Nombre de souris mortes dans les jours qui ont précédé celui de la souris médiane traitée)}} + \frac{\text{(Nombre de souris mortes le même jour que la souris médiane contrôle)}}{\text{(Souris médiane traitée)} - \text{(Nombre de souris mortes dans les jours qui ont précédé celui de la souris médiane traitée)}}$$

5

Ce rapport représente le temps de survie moyen de la souris médiane du lot des souris traitées par rapport au temps de survie moyen de la souris médiane du lot des souris contrôles. Ainsi, une molécule induit une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) de la survie des animaux lorsque l'indice T/C excède 130%. Par contre elle présente un effet toxique lorsque cette valeur de T/C est inférieure à 70%.

10

### 3.1. - Carcinome mammaire murin (MXT-HI)

A titre d'exemple, nous présenterons ci-dessous l'influence des deux produits CRL8293 et CRL8294 sur la croissance des tumeurs MXT-HI. Chaque lot de souris greffées avec les tumeurs MXT-HI et relatif à une condition expérimentale donnée comprend 15 animaux.

15

#### Traitement 1

Le produit CRL8293 est administré par voie intra-péritonéale . La première injection du produit est réalisée au septième jour post-greffe (J7) à raison de 3 injections par semaine (lundi, mercredi et vendredi) pendant 3 semaines consécutives et à la dose de 5 mg/kg.

20

### Traitement 2

Le produit CRL8294 est administré par voie intra-péritonéale. La première injection du produit est réalisée au septième jour post-greffe (J7) à raison de 3 injections par semaine (lundi, mercredi et vendredi) pendant 3 semaines consécutives et à la dose de 5 mg/kg.

5

Dans le tableau III suivant, sont indiquées, en pourcentage, les diminutions (-) ou les augmentations (+) de la surface des tumeurs MXT-HI induites avec les traitements 1 et 2 par rapport à la condition contrôle au 21<sup>ème</sup> jour après la greffe tumorale, soit après 6 administrations du produit CRL8293 ou du produit CRL8294. Au 21<sup>ème</sup> jour post-greffe

10 100% des animaux contrôles sont encore en vie.

TABLEAU III

Traitements	Surface tumorale (exprimé en %)
1 (CRL8293)	- 33
2 (CRL8294)	- 36

Ces résultats montrent que ces deux produits CRL8293 et CRL8294 induisent une diminution significative de la croissance des tumeurs MXT-HI. Ces résultats montrent que ces produits de formule I et la présentent *in vivo* et sur ce modèle une activité antitumorale intéressante.

15

### 3.2.- Adénocarcinome mammaire murin (MXT-HS)

20

A titre d'exemple, nous présenterons ci-dessous l'influence des deux produits CRL8293 et CRL8294 sur la croissance des tumeurs MXT-HS. Chaque lot de souris greffées avec les tumeurs MXT-HS et relatif à une condition expérimentale donnée comprend 9 animaux.

25

### Traitement 10

Le produit CRL8293 est administré par voie intra-péritonéale. La première injection du produit est réalisée au septième jour post-greffe (J7) à raison de 3 injections par semaine (lundi, mercredi et vendredi) pendant 3 semaines consécutives et à la dose de 5 mg/kg.

30

### Traitement 20

Le produit CRL8294 est administré seul par voie intra-péritonéale. La première injection du produit est réalisée au septième jour post-greffe (J7) à raison de 3 injections par semaine (lundi, mercredi et vendredi) pendant 3 semaines consécutives et à la dose de 5 mg/kg.

Dans le tableau IV suivant sont indiquées, en pourcentage, les diminutions (-) ou les augmentations (+) de la surface des tumeurs MXT-HS induites avec les traitements 10 et 20 par rapport à la condition contrôle au 31<sup>ème</sup> jour après la greffe tumorale, soit après les 9 administrations, prévues dans le protocole expérimental, des 2 produits CRL8293 et CRL8294. Au 31<sup>ème</sup> jour post-greffe 100% des animaux contrôles sont encore en vie.

TABLEAU IV

Traitements	Surface tumorale (exprimé en %)
10 (CRL8293)	- 45
20 (CRL8294)	- 64

Ces résultats montrent que ces deux produits CRL8293 et CRL8294 induisent une diminution très hautement significative de la croissance des tumeurs MXT-HS. Ces résultats montrent, comme sur le modèle MXT-HI, que les produits de formule I et la présentent également sur le modèle MXT-HS une activité antitumorale très intéressante.

### 3.3.- Lymphome L1210

A titre d'exemple, nous présenterons ci-dessous l'influence du CRL8294 sur le temps de survie des souris (tableau V). Chaque lot de souris greffées avec le lymphome L1210 et relatif à une condition expérimentale donnée comprend 9 animaux.

### Traitement 100

Le produit CRL8294 est administré seul par voie intra-péritonéale. La première injection du produit est réalisée au septième jour post-greffe (J7) à raison de 3 injections par semaine (lundi, mercredi et vendredi) pendant 3 semaines consécutives et à la dose de 1,25 mg/kg.

Tableau V

Traitement	T/C (exprimé en %)
100 (CRL8294)	136

- 5 Sur le modèle du lymphome L 1210 sous-cutané, le composé CRL8294 de formule (I) présente une activité antitumorale. Cette dernière se caractérise par un allongement significatif du temps de survie moyen de la souris médiane du lot de souris ainsi traitées par rapport au temps de survie moyen de la souris médiane du lot des souris contrôles.

10

#### 4 - Ratios tolérance/activité cytotoxique

- Dans le tableau VI suivant, sont présentés les résultats des CI 50 (en nM) moyennes (calculées à partir des activités cytotoxiques individuelles obtenues sur  
15 chacune des 12 lignées tumorales étudiées) et les ratios DMT/CI50 calculés en effectuant le rapport des DMT et des CI50. Ce dernier rapport est exprimé en nombre sans dimension.

TABLEAU VI

20

Composés CRL	CI50 (nM)	DMT/CI50	DMT/CI50*
CRL8388 (Exemple 6)	6200	0,0016	1
CRL8293 (Exemple 1)	1250	0,008	5
CRL8294 (Exemple 2)	1450	0,007	4,4
CRL8363 (Exemple 3)	500	0,02	12,5
CRL8364 (Exemple 4)	270	0,019	12
CRL8367 (Exemple 5)	1650	0,006	3,8
CRL8396 (Exemple 7)	600	0,033	20,6
CRL8400 (Exemple 8)	380	0,42	262
CRL8401 (Exemple 9)	53	3	1875

\* : le ratio DMT/CI50 des différents composés a été estimé en prenant comme référence un ratio égal à 1 pour CRL8388.

Les composés de formule (I) et (Ia) présentent une activité antitumorale significative à la fois *in vitro* et *in vivo* dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus. *In vitro*, ils inhibent la croissance des cellules tumorales, comme en témoignent  
5 les résultats des tests colorimétriques MTT. *In vivo*, ils inhibent de manière significative et considérable la croissance des tumeurs MXT-HI et MXT-HS et augmentent de manière significative le temps de survie moyen de la souris médiane du lot des souris ainsi traitées et greffées avec le lymphome L 1210 par rapport au temps de survie moyen de la souris médiane du lot des souris contrôles.

10

Grâce à leurs propriétés cytotoxiques, les composés de formules (I) et (Ia) tels que décrits ou sous forme de sels ou solvates pharmaceutiques acceptables, peuvent être  
utilisés comme principes actifs de médicaments.

---

Les composés de formules (I) et (Ia) sont généralement administrés en unités de  
15 dosage établies soit par  $m^2$  de surface corporelle, soit par kg de poids. Les dites unités de dosage sont de préférence formulées dans des compositions pharmaceutiques dans lesquelles le principe actif est mélangé avec un (ou plusieurs) excipient(s) pharmaceutique(s).

Les composés de formule (I) et (Ia) peuvent être utilisés selon la pathologie  
20 cancéreuse du sujet à traiter à des doses comprises entre 0,05 et 350  $mg/m^2$  de surface corporelle, de préférence à des doses de 0,5 à 50  $mg/m^2/jour$  pour un traitement curatif dans sa phase aiguë en fonction du nombre de cycles de traitement de chaque cure. Pour un traitement d'entretien, on utilisera avantageusement les composés de formules I à des doses de 0,05 à 25  $mg/m^2/jour$ , de préférence à des doses de 0,1 à 1,5  
25  $mg/m^2/jour$  selon le nombre de cycles de traitement de la cure. Ils pourront être associés aux médicaments anti-tumoraux utilisés dans les protocoles validés de polychimiothérapie intensive.

Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention pour  
l'administration par voie orale, intraveineuse, les principes actifs peuvent être  
30 administrés sous formes unitaires d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques adaptés à la thérapeutique humaine. Les formes unitaires d'administration appropriées comprennent les formes par voie orale telles que les comprimés, éventuellement sécables, ou les gélules, les implants et les formes d'administration intraveineuse.



Pour une administration parentérale (perfusion intraveineuse à débit constant), on utilise des suspensions aqueuses stériles, des solutions salines isotoniques stériles ou des solutions stériles et injectables qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents solubilisants pharmacologiquement compatibles, par exemple le propylèneglycol, le polyéthylèneglycol, ou une  $\beta$  cyclodextrine..

Ainsi, pour préparer une solution aqueuse injectable par voie intraveineuse et destinée à une perfusion réalisée sur 1 à 24 h, on peut utiliser un cosolvant : un alcool tel que l'éthanol, un glycol tel que le polyéthylèneglycol ou le propylèneglycol et un tensioactif hydrophilè tel que le Tween 80.

Lorsque l'on prépare une composition solide sous forme de comprimés, on peut ajouter au principe actif, micronisé ou non, un agent mouillant tel que le laurylsulfate de sodium et on mélange le tout avec un véhicule pharmaceutique tel que la silice, la gélatine, l'amidon, le lactose, le stéarate de magnésium, le talc, la gomme arabique ou analogues. On peut enrober les comprimés de saccharose, de divers polymères ou d'autres matières appropriées ou encore les traiter de telle sorte qu'ils aient une activité prolongée ou retardée et qu'ils libèrent d'une façon continue une quantité prédéterminée de principe actif.

On obtient une préparation en gélules en mélangeant le principe actif avec un diluant tel qu'un glycol ou un ester de glycérol et en incorporant le mélange obtenu dans des gélules molles ou dures.

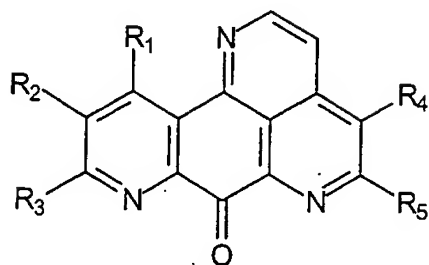
Le principe actif peut être formulé également sous forme de microcapsules ou microsphères, éventuellement avec un ou plusieurs supports ou additifs.

Le principe actif peut être également présenté sous forme de complexe avec une cyclodextrine, par exemple  $\alpha$ -,  $\beta$ - ou  $\gamma$ -cyclodextrine, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine ou méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.

Les composés de formules (I) et (Ia) seront utilisés dans le traitement de la plupart des tumeurs solides du fait de leurs activités cytotoxiques puissantes, en particulier pour traiter les tumeurs cérébrales, les cancers du poumon, les tumeurs de l'ovaire et du sein, les cancers de l'endomètre, les cancers colo-rectaux, les cancers de la prostate et les tumeurs testiculaires.

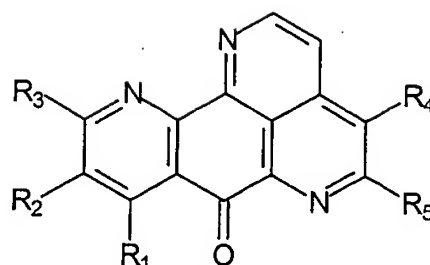
REVENDICATIONS

1 - Composés de formule :



Formule I

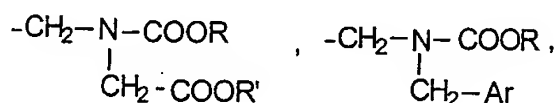
et



Formule Ia

dans laquelle :

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> sont choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hydroxy, -CHO, -OR, -COOH, -CN, -CO<sub>2</sub>R, -CONHR, -CONRR', -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOR, morpholino, nitro, SO<sub>3</sub>H et



R et R' étant choisis parmi les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> et Ar étant un groupe aryle en C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>,

et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

2 - Composés selon la revendication 1 qui sont des composés de formule (I) dans laquelle :

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> sont choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hydroxy, -OR, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOR, R et R' étant choisis parmi les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

3 - Composés selon la revendication 2 qui sont des composés de formule (I) dans laquelle :

R<sub>1</sub> est choisi parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes hydroxy, méthoxy, nitro, -NH<sub>2</sub>, -NHCH<sub>3</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOCH<sub>3</sub>,

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, et R<sub>5</sub> sont l'hydrogène,

R<sub>4</sub> est un groupe méthoxy,

5 et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

4- Composés selon la revendication 1 qui sont des composés de formule (Ia) dans laquelle :

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> sont choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hydroxy, -OR, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOR, R et R' étant choisis parmi les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

~~et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.~~

5 - Composés selon la revendication 4 qui sont des composés de formule (Ia) dans laquelle :

R<sub>1</sub> est choisi parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes hydroxy, méthoxy, nitro, -NH<sub>2</sub>, -NHCH<sub>3</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOCH<sub>3</sub>,

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, et R<sub>5</sub> sont l'hydrogène,

R<sub>4</sub> est un groupe méthoxy,

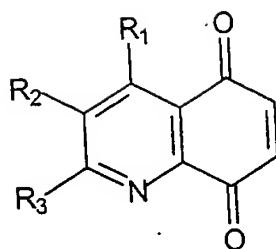
20 et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

6 - Composition pharmaceutique comprenant une quantité efficace d'un composé choisi parmi les composés de formule (I) et (Ia) selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3, 4 et 5, pour traiter, grâce à leurs propriétés cytotoxiques, les tumeurs cancéreuses et leurs métastases.

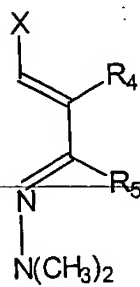
7 - Utilisation des composés tel que défini dans les revendications 1, 2, 3, 4 et 5 pour la fabrication d'un médicament anticancéreux.

30

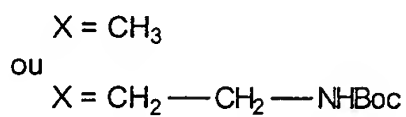
8 - Procédé de préparation de composés selon la revendication 1 qui consiste à faire réagir selon une réaction d'hétéro Diels-Alder une quinoléine dione de formule :



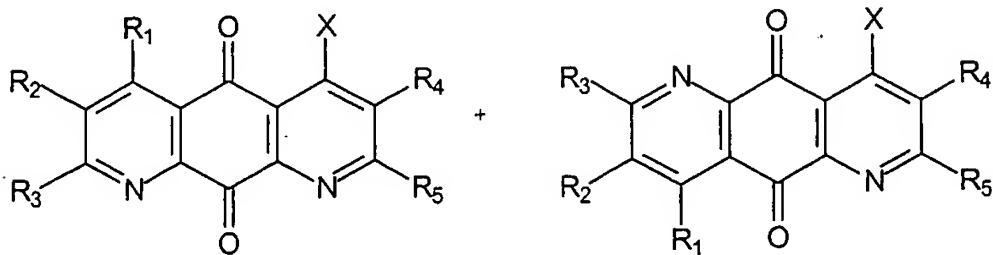
et un azadiène de formule



avec



pour obtenir un mélange de composés



Formule II

Formule IIa

et après séparation des composés de formules II et IIa, le composé séparé est converti en composé de formule I ou Ia.

---

Les composés de formule (I) et (Ia) présentent une activité antitumorale significative à la fois *in vitro* et *in vivo* dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus. *In vitro*, ils inhibent la croissance des cellules tumorales, comme en témoignent les résultats des tests colorimétriques MTT. *In vivo*, ils inhibent de manière significative et considérable la croissance des tumeurs MXT-HI et MXT-HS et augmentent de manière significative le temps de survie moyen de la souris médiane du lot des souris ainsi traitées et greffées avec le lymphome L 1210 par rapport au temps de survie moyen de la souris médiane du lot des souris contrôles.

10

Grâce à leurs propriétés cytotoxiques, les composés de formules (I) et (Ia) tels que décrits ou sous forme de sels ou solvates pharmaceutiques acceptables, peuvent être utilisés comme principes actifs de médicaments pour traiter les tumeurs cancéreuses et leurs métastases.

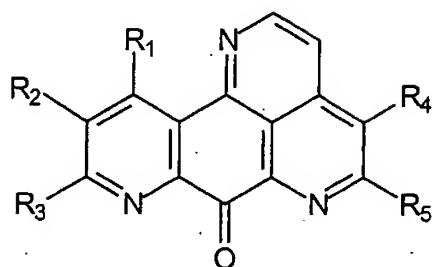
15 Les composés de formules (I) et (Ia) sont généralement administrés en unités de dosage établies soit par  $m^2$  de surface corporelle, soit par kg de poids. Les dites unités de dosage sont de préférence formulées dans des compositions pharmaceutiques dans lesquelles le principe actif est mélangé avec un (ou plusieurs) excipient(s) pharmaceutique(s).

20 Les composés de formule (I) et (Ia) peuvent être utilisés selon la pathologie cancéreuse du sujet à traiter à des doses comprises entre 0,05 et 350  $mg/m^2$  de surface corporelle, de préférence à des doses de 0,5 à 50  $mg/m^2/jour$  pour un traitement curatif dans sa phase aiguë en fonction du nombre de cycles de traitement de chaque cure. Pour un traitement d'entretien, on utilisera avantageusement les composés de formules I à des doses de 0,05 à 25  $mg/m^2/jour$ , de préférence à des doses de 0,1 à 1,5  $mg/m^2/jour$  selon le nombre de cycles de traitement de la cure. Ils pourront être associés aux médicaments anti-tumoraux utilisés dans les protocoles validés de polychimiothérapie intensive.

25 Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention pour l'administration par voie orale, intraveineuse, les principes actifs peuvent être administrés sous formes unitaires d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques adaptés à la thérapeutique humaine. Les formes unitaires d'administration appropriées comprennent les formes par voie orale telles que les comprimés, éventuellement sécables, ou les gélules, les implants et les formes 35 d'administration intraveineuse.

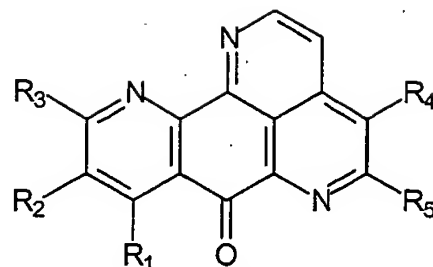
REVENDECATIONS

1 - Composés de formule :



Formule I

et

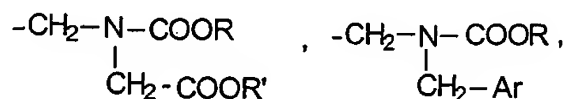


Formule Ia

5

dans laquelle :

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> sont choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hydroxy, -CHO, -OR, -COOH, -CN, -CO<sub>2</sub>R, -CONHR, -CONRR', -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOR, morpholino, nitro, SO<sub>3</sub>H et



10

R et R' étant choisis parmi les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> et Ar étant un groupe aryle en C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>,

et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

15 2 - Composés selon la revendication 1 qui sont des composés de formule (I) dans laquelle :

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> sont choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hydroxy, -OR, NO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOR, R et R' étant choisis parmi les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

20 et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

3 - Composés selon la revendication 2 qui sont des composés de formule (I) dans laquelle :

R<sub>1</sub> est choisi parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes hydroxy, méthoxy, nitro, -NH<sub>2</sub>, -NHCH<sub>3</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOCH<sub>3</sub>,

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, et R<sub>5</sub> sont l'hydrogène,

R<sub>4</sub> est un groupe méthoxy,

5 et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

4- Composés selon la revendication 1 qui sont des composés de formule (Ia) dans laquelle :

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> sont choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, hydroxy, -OR, NO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOR, R et R' étant choisis parmi les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

~~et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.~~

5 - Composés selon la revendication 4 qui sont des composés de formule (Ia) dans laquelle :

R<sub>1</sub> est choisi parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes hydroxy, méthoxy, nitro, -NH<sub>2</sub>, -NHCH<sub>3</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOCH<sub>3</sub>,

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, et R<sub>5</sub> sont l'hydrogène,

R<sub>4</sub> est un groupe méthoxy,

20 et les sels d'addition de ces composés avec des acides pharmaceutiquement acceptables.


6 - Composition pharmaceutique comprenant une quantité efficace d'un composé choisi parmi les composés de formule (I) et (Ia) selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3, 4 et 5, pour traiter, grâce à leurs propriétés cytotoxiques, les tumeurs cancéreuses et leurs métastases.

7 - Utilisation des composés tel que défini dans les revendications 1, 2, 3, 4 et 5 pour la fabrication d'un médicament anticancéreux.

30

8 - Procédé de préparation de composés selon la revendication 1 qui consiste à faire réagir selon une réaction d'hétéro Diels-Alder une quinoléine dione de formule :





IN THE MATTER OF an Application  
for a French Patent  
in the name of  
LABORATOIRE L. LAFON  
filed under No. 99/10,493, and  
IN THE MATTER OF an Application  
for a New Zealand Patent

I, Jean Raymond BERNASCONI, European Patent Attorney at Cabinet Lavoix, 2 place d'Estienne d'Orves 75009 Paris, France, do solemnly and sincerely declare that I am conversant with the English and French languages and am a competent translator thereof, and that the following is, to the best of my knowledge and belief, a true and correct translation of the Patent Application under No. 99/10,493

by LABORATOIRE L. LAFON

in France on 13 August 1999

for "Phenanthroline-7-one derivatives and their therapeutic applications"

and the Official Certificate attached thereto.

Date : 3 September 2003



Jean R. BERNASCONI

**INPI**

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

---

**P A T E N T**

---

**UTILITY CERTIFICATE - CERTIFICATE OF ADDITION**

**OFFICIAL COPY**

The Director-General of the Institut National de la Propriété Industrielle certifies that the attached document is a true copy of an application for industrial property titleright filed at the Institute.

Drawn up in Paris, 20 DEC. 2001

On behalf of the Director-General of the  
Institut National de la Propriété Industrielle  
The Patent Department Head

(signature)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

REGISTERED OFFICE  
26bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Telephone: 33 (1) 53 04 53 04  
Fax: 33 (1) 42 93 59 30

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Telephone: 01 53 04 53 04    Telefax: 01 42 93 59 30

## Intellectual Property Code - Book VI

**Cerfa**  
No. 55-1328

## REQUEST FOR GRANT

Confirmation of filing by fax ☐

**This form is to be completed in black ink and in block capitals**

Reserved for the INPI		1. NAME AND ADDRESS OF THE APPLICANT OR THE REPRESENTATIVE TO WHOM THE CORRESPONDENCE IS TO BE ADDRESSED					
DATE OF SUBMISSION OF THE DOCUMENTS	13 AUGUST 1999	CABINET LAVOIX 2 Place d'Estienne d'Orves 75441 PARIS CEDEX 09					
NATIONAL REGISTRATION	99/10,493						
DEPARTMENT OF FILING	75 INPI PARIS						
DATE OF FILING	13 AUGUST 1999						
2. APPLICATION <input checked="" type="checkbox"/> patent <input type="checkbox"/> utility certificate Nature of the industrial property right <input type="checkbox"/> divisional application <input type="checkbox"/> conversion of a European patent application <div style="text-align: center;">→ initial application ↓</div> <input type="checkbox"/> patent		No. of permanent power of attorney  <input type="checkbox"/> utility certificate No.	Correspondent's references BFF 99/0393 date				
Compilation of the search report <input type="checkbox"/> deferred <input checked="" type="checkbox"/> immediate The applicant, as a physical person, asks to pay the fee by instalments <input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no							
Title of the invention (maximum 200 characters)  Phenanthroline-7-one derivatives and their therapeutic applications							
3. APPLICANT(S)      SIREN No.      APE-NAF code name and forenames (underline the surname) or company name  LABORATOIRE L. LAFON   nationality/nationalities French		Legal form					
Full address(es)  19, Avenue du Professeur Cadoit 94701 Maisons Alfort		Country  FR					
If insufficient space, continue on plain paper <input type="checkbox"/>							
4. INVENTOR(S)      The inventors are the applicants <input type="checkbox"/> yes <input checked="" type="checkbox"/> no      If the answer is no, provide a separate designation							
5. REDUCTION OF THE RATE OF FEES <input type="checkbox"/> requested for the first time <input type="checkbox"/> requested prior to filing; attach copy of the favourable decision							
6. PRIORITY DECLARATION OR APPLICATION FOR THE BENEFIT OF THE FILING DATE OF A PRIOR APPLICATION <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">Country of origin</td> <td style="width: 33%;">Number</td> <td style="width: 33%;">Filing date</td> <td style="width: 33%;">Nature of the application</td> </tr> </table>				Country of origin	Number	Filing date	Nature of the application
Country of origin	Number	Filing date	Nature of the application				
7. DIVISIONS previous to the present application		No.      date	No.      date				
8. SIGNATURE OF THE APPLICANT OR REPRESENTATIVE (name and capacity of the signatory - registration No.)  CABINET LAVOIX M. MONCHENY no 92.1179 (signature)		SIGNATURE OF THE RECEIVING OFFICIAL   SIGNATURE AFTER REGISTRATION OF THE APPLICATION AT THE INPI  (illegible signature)					

**INPI**INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE**PATENT****UTILITY CERTIFICATE**

Intellectual Property Code - Book VI

Cerfa

N° 11235\*02

**PATENTS DEPARTMENT**

26 bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tel: 01 53 04 53 04 Fax: 01 42 94 86 54

**DESIGNATION OF THE INVENTOR(S) Page No. 2 / 2**

(if the applicant is not the inventor or the sole inventor)

This form is to be filled in legibly in black ink

DB 113 W/260899

<b>Your file references</b> (optional)		BFF 99/0393	
<b>NATIONAL REGISTRATION NO.</b>		99/10,493	
<b>TITLE OF THE INVENTION (200 characters or spaces maximum)</b>  Phenanthroline-7-one derivatives and their therapeutic applications			
<b>APPLICANT(S):</b>  LABORATOIRE L. LAFON			
<b>DESIGNATE(S) AS INVENTOR(S):</b> (Indicate top right "Page 1/1". If there are more than 3 inventors, use an identical form and number each page, indicating the total number of pages.)			
<b>Name</b>		KISS Robert	
<b>Forenames</b>			
<b>Address</b>	<b>Street</b>	4, Cour au Bois 1440 WAUTHIER-BRAINE BELGIQUE	
	<b>Postcode and town</b>		
<b>Employer company (optional)</b>			
<b>Name</b>		FRYDMAN Armand	
<b>Forenames</b>			
<b>Address</b>	<b>Street</b>	10, allée des Fusains 91370 VERRIERES LE BUISSON FRANCE	
	<b>Postcode and town</b>		
<b>Employer company (optional)</b>			
<b>Name</b>			
<b>Forenames</b>			
<b>Address</b>	<b>Street</b>		
	<b>Postcode and town</b>		
<b>Employer company (optional)</b>			
<b>DATE AND SIGNATURE(S) OF THE APPLICANT(S) OR OF THE REPRESENTATIVE</b> (Name and capacity of the signatory)		Paris, 16 August 2000  (signature)  C. JACOBSON no 92.1119	

Law no. 78-17 of 6 January 1978 relating to data processing, files and freedoms applies to the answers given in this form.  
It guarantees right of access to and amendment of data concerning you held at the INPI.

**INPI**INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE**PATENT  
UTILITY CERTIFICATE**

Intellectual Property Code - Book VI

Cerfa  
N° 11235\*02**PATENTS DEPARTMENT**

26 bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tel: 01 53 04 53 04 Fax: 01 42 94 86 54

**DESIGNATION OF THE INVENTOR(S) Page No. 2 / 2**

(if the applicant is not the inventor or the sole inventor)

This form is to be filled in legibly in black ink

DB 113 W/260899

<b>Your file references</b> (optional)		BFF 99/0393	
<b>NATIONAL REGISTRATION NO.</b>		99/10,493	
<b>TITLE OF THE INVENTION (200 characters or spaces maximum)</b> Phenanthroline-7-one derivatives and their therapeutic applications			
<b>APPLICANT(S):</b> LABORATOIRE L. LAFON			
<b>DESIGNATE(S) AS INVENTOR(S):</b> (Indicate top right "Page 1/1". If there are more than 3 inventors, use an identical form and number each page, indicating the total number of pages.)			
<b>Name</b>		DELFOURNE Evelyne	
<b>Forenames</b>			
<b>Address</b>	<b>Street</b>	4, impasse du Liège 66450 POLLESTRES FRANCE	
	<b>Postcode and town</b>		
<b>Employer company (optional)</b>			
<b>Name</b>		DARRO Francis	
<b>Forenames</b>			
<b>Address</b>	<b>Street</b>	Avenue V. Olivier Bâtiment 8A, Boîte 60	
	<b>Postcode and town</b>	1070 BRUXELLES BELGIQUE	
<b>Employer company (optional)</b>			
<b>Name</b>		BASTIDE Jean	
<b>Forenames</b>			
<b>Address</b>	<b>Street</b>	20, rue Antoine Carbo 66000 PERPIGNAN FRANCE	
	<b>Postcode and town</b>		
<b>Employer company (optional)</b>			
<b>DATE AND SIGNATURE(S) OF THE APPLICANT(S) OR OF THE REPRESENTATIVE (Name and capacity of the signatory)</b>		Paris, 16 August 2000  (signature)  C. JACOBSON no 92.1119	

Law no. 78-17 of 6 January 1978 relating to data processing, files and freedoms applies to the answers given in this form.  
It guarantees right of access to and amendment of data concerning you held at the INPI.

## DOCUMENT CONTAINING AMENDMENTS

(FRENCH) PAGE(S) OF THE DESCRIPTION OR OF THE CLAIMS OR SHEET(S) OF DRAWINGS			R.M.*	DATE OF THE CORRESPONDENCE	DATE STAMP OF THE CORRECTOR
Amended	Omitted	Added			
27					
29, 30			x	22 Oct 99	AMH 27 OCT. 1999

\* A change made in the wording of the original claims, unless the change derives from the provisions of Article R.612-36 of the Intellectual Property Code, is indicated by the reference "R.M." (amended claims).

The present invention relates to pharmaceutical compositions based on polyaromatic compounds of use in particular as antitumour medicaments.

5 In 1999, cytotoxic treatments (chemotherapy) used to reduce the size of cancerous tumours, to suppress the development of the tumour process or indeed even, in still too few cases, to eliminate clumps of cancer cells and the risk of metastases, combine chemical  
10 substances which have been recently introduced with others which have been used for several decades. For example, 5-fluorouracil (5-FU), recognized for nearly 40 years as one of the most active treatments for colorectal cancer, can be replaced by one or other of  
15 the specific inhibitors of topoisomerase I (irinotecan or topotecan) when the tumour is no longer sensitive to 5-FU. More generally, the therapeutic arsenal available for treating colorectal tumours will also be enriched with the availability of oxaliplatin, novel in situ  
20 "donors" of 5-FU or selective inhibitors of thymidylate synthetase. This coexistence is not limited to the treatment of colorectal cancers since, in addition, the chemotherapy of breast, ovarian and lung cancers now makes wide use of the family of taxane derivatives  
25 (paclitaxel, docetaxel). The need for more effective and better tolerated treatments, thus improving the survival and the quality of life of the patients, is imperative since, still taking the example of colorectal tumours, it has been estimated (S.L. Parker,  
30 T. Tong, S. Bolden et al., CA Cancer J. Clin., 1997) that, in the United States alone, over 131 000 new cases were diagnosed in 1997, 54 000 of which were responsible for the death of the patient. It is the awareness of this situation which has prompted the  
35 inventors to focus their attention on a family of polyaromatic compounds which have not yet been studied to any great extent, identified in the Ascidia of warm seas, in order to develop a novel medicinal chemistry

intended to select synthetic compounds resulting from chemical design/modulation research which possess a significant cytotoxic activity at the therapeutic level.

5.

The seas and oceans which cover more than 70% of the surface of the planet harbour marine plants and sponges, which living species, under gradual systematic pharmacognosic, have been shown to be able to contain complex alkaloids exhibiting advantageous pharmacological properties. For example, the sponges *Cryptotheca crypta* and *Halichondria okadai* have formed the subject of in-depth studies since the discovery of the presence, in their cells, of cytarabine or of halichondrin B. It is the same for the tunicates, since the isolation of aplidine from the tunicate *Aplidium albicans*, which lives in the Balearic Islands (Spain). Alkaloids with a tetrahydroisoquinolone structure have been isolated from the ascidian *Ecteinascidia turbinata*. Among these, ecteinascidin-743 has formed the subject of in-depth preclinical studies (E. Igbicka et al., NCI-EORTC symposium, 1998; Abst. 130, p. 34) and of clinical trials intended to define its therapeutic potential as anticancer medicament (A. Bowman et al., NCI-EORTC symposium, 1998; Abst. 452, p. 118; M.Villanova-Calero et al., NCI-EORTC symposium, 1998; Abst. 453, p. 118; M.J.X. Hillebrand et al., NCI-EORTC symposium, 1998; Abst. 455, p. 119; E. Citkovic et al., NCI-EORTC symposium, 1998; Abst. 456, p. 119). Novel pentacyclic acridine derivatives have also formed the subject of pharmacochemical studies (D.J. Hagan et al., J. Chem. Soc., Perkin Transf., 1997; 1: 2739-2746).

35 Other natural alkaloid of marine origin, ascididemin, has been extracted from the tunicate *Didemnum* sp. (J. Kobayashi et al., Tetrahedron Lett., 1988; 29: 1177-80) and from the ascidian *Cystodytes dellechiaiei* (I. Bonnard et al., Anti-cancer Drug Design, 1995;



10: 333-46). Ascididemin has antiproliferative properties demonstrated on the model of murine leukaemia (P388 or L1210 lines) and described by F.J. Schmitz et al. (J. Org. Chem. 1991; 56: 804-8),  
5 B. Lindsay et al. (Bioorg. Med. Chem. Lett., 1995; 5: 739-42) and J. Kobayashi et al. (Tetrahedron Lett., 1988; 29: 1177-80), and on the model of human leukaemia as described by I. Bonnard et al. (Anti-cancer Drug Design, 1995; 10: 333-46). Mention may also be made of  
10 2-bromoleptoclinidone, isolated from the ascidian *Leptoclinides* sp. by S.J. Bloor et al. (J. Am. Chem. Soc., 1987; 109: 6134-6) and synthesized by F. Bracher et al. (Heterocycles, 1989; 29: 2093-95) and then by M.E. Jung et al. (Heterocycles, 1994; 39; 2: 767-778).  
15 2-Bromoleptoclinidone exhibits cytotoxicity with respect to the leukaemia cell model with an ED<sub>50</sub> of 0.4 µg/ml. The cytotoxic properties were confirmed by F. Bracher (Pharmazie, 1997; 52: 57-60), both *in vitro*, on sixty tumour cell lines in culture, and *in vivo*, on  
20 models of xenografts of human tumour cell lines (colon tumours SW-620 and HTC116, renal tumour A498 and melanoma LOX IM VI) implanted in mice.

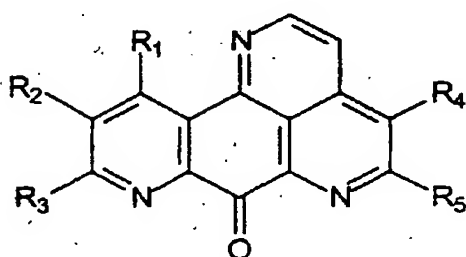
Other compounds derived from ascididemin, such as  
25 11-hydroxyascididemin, 11-methoxyascididemin, 11-phenylascididemin, 11-nitrophenylascididemin, 1-nitroascididemin, 3-nitroascididemin and neocalliactine, have been described chemically by various groups, such as those of F.J. Schmitz (J. Org.  
30 Chem., 1991; 56: 804-8) and Y. Kitahara et al. (Heterocycles, 1993; 36: 943-46; Tetrahedron Lett., 1997; 53, 17029-38), G. Gellerman et al. (Tetrahedron Lett., 1993; 34: 1827-30), S. Nakahara et al., (Heterocycles, 1993; 36: 1139-44) and I. Spector et al.  
35 (US Patent Number: 5 432 172, Jul. 11, 1995).

Meridine is another natural alkaloid extracted from the ascidian *Amphicarpa meridiana* or from the marine sponge *Corticum* sp. Meridine was isolated by F.J. Schmitz et

al. (J. Org. Chem., 1991; 56: 804-808) and then described for its antiproliferative properties on a model of murine leukaemia (P388) and its antifungal properties in Patent US A 5 182 287 (Gunawardana et al. of 23 January 1993). Its cytotoxic properties on two human cell lines, colon cancer cells (HT-29) and lung carcinoma cells (A549), were reported by R.E. Longley et al. (J. of Nat. Products, 1993; 56: 915-920).

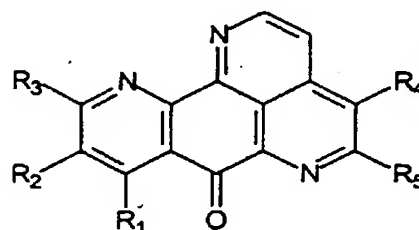
10 Mention may also be made, among these compounds, of cystodamine, a pentacyclic alkaloid isolated from the ascidian *Cystodytes dellechiaiei* by N. Bontemps et al. (Tetrahedron Lett., 1994; 35: 7023-7026), which exhibits cytotoxic activity with respect to human  
15 leukaemia lymphoblasts.

A subject-matter of the present invention is compounds of general formula I and Ia



Formula I

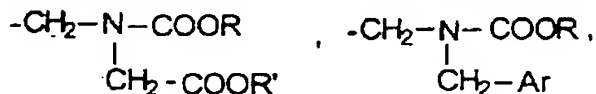
and



Formula Ia

in which:

25 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> are selected from hydrogen, halogens, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl groups, hydroxyl, -CHO, -OR, -COOH, -CN, -CO<sub>2</sub>R, -CONHR, -CONRR', -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NHCOR, morpholino, nitro, SO<sub>3</sub>H and



30 R and R' being selected from C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl groups and Ar being a C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> aryl group, and the addition salts of these compounds with pharmaceutically acceptable acids.

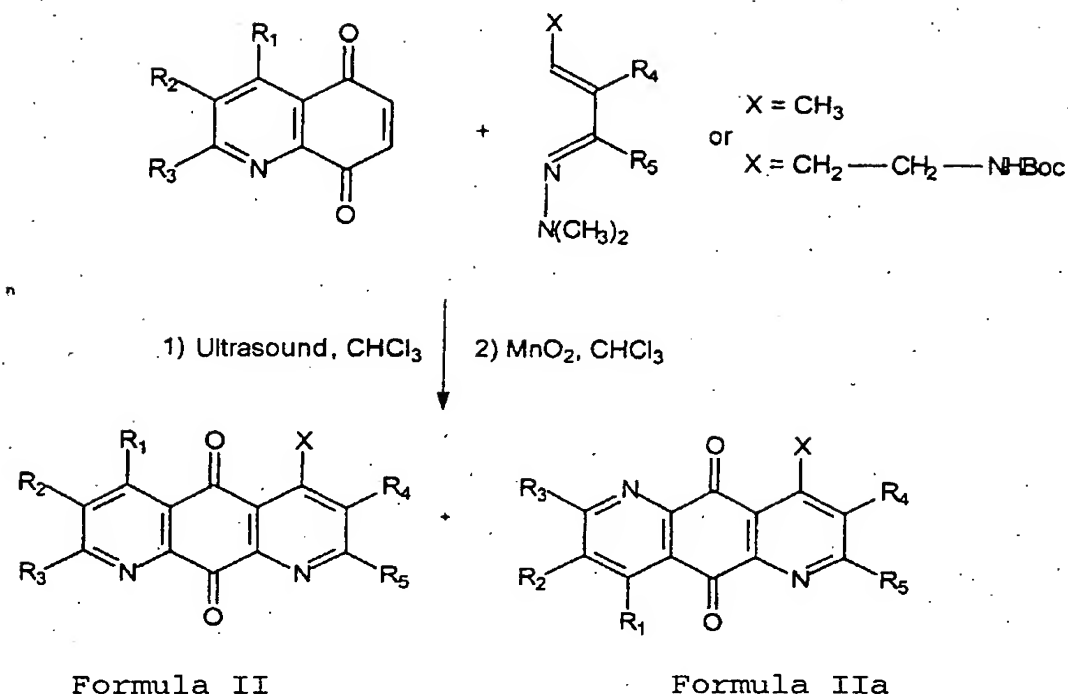
The subject-matter of the present invention is more particularly the compounds selected from the compounds of formula (I) and of formula (Ia) in which  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  and  $R_5$  are selected from hydrogen, halogens,  $C_1$ - $C_6$  alkyl groups, hydroxyl, -OR, nitro groups,  $-NH_2$ , -NHR,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$  or -NHCOR, where R is a  $C_1$ - $C_6$  alkyl group,

and the addition salts of these compounds with pharmaceutically acceptable acids.

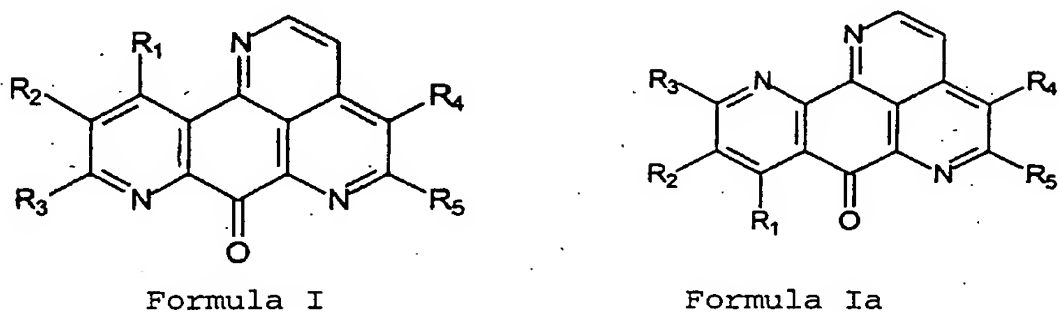
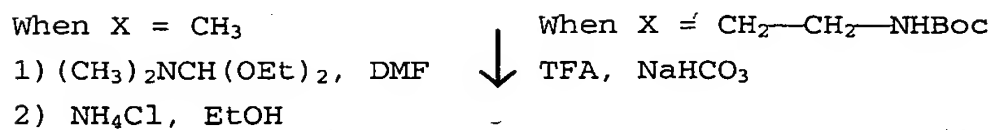
The "addition salts with pharmaceutically acceptable acids" denote the salts which give the biological properties of the free bases without having an undesirable action. These salts can in particular be those formed with inorganic acids, such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulphuric acid, nitric acid or phosphoric acid; metal acid salts, such as disodium orthophosphate and monopotassium sulphate, and organic acids.

Generally, the compounds of formula (I) and (Ia) are obtained according to the general reaction scheme I presented below. According to this scheme, the compounds of formula I and Ia can be prepared by a hetero Diels-Alder reaction between a substituted 5,8-quinolinedione and a substituted azadiene, followed by the dehydrogenation of the intermediate dihydrogenated compound. The compounds of formula (I) and (Ia) can also be prepared more directly from other compounds of formula (I) and (Ia) already synthesized:

Scheme I

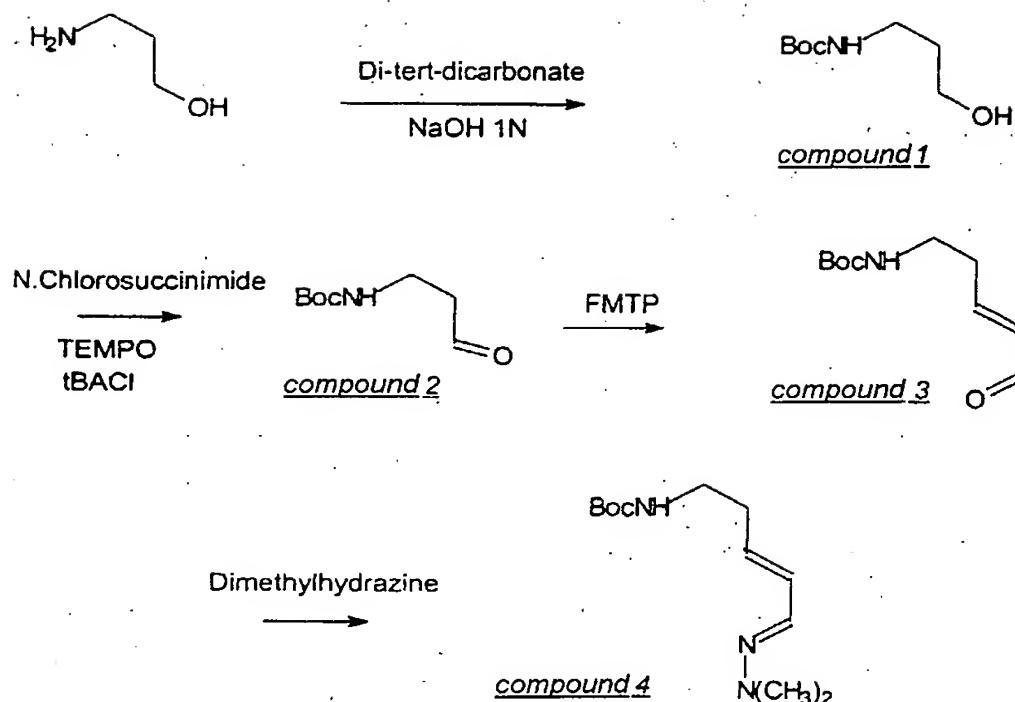


5



10      An example of substituted azadiene can be prepared according to scheme II:

SCHEME II



TEMPO = tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical

5 tBACl = tetrabutylammonium chloride

FMTP = formylmethylenetriphenylphosphorane

The following examples illustrate the preparation of the compounds of formulae (I) and (Ia).

10

A - Preparation of the azadiene according to Scheme II

**A-1 - Synthesis of N-BOC-1-amino-2-hydroxypropane (Compound 1)**

15 4.2 g (29.7 mmol) of di-tert-butyl dicarbonate are added at 0°C to a solution of 2 ml (27 mmol) of 3-amino-1-propanol in a mixture of 60 ml of dioxane, 30 ml of water and 30 ml of 1N NaOH. The reaction mixture is kept stirred at ambient temperature  
 20 overnight and then it is acidified to pH 1 using concentrated HCl. After several extractions (3 times 50 ml) with ethyl acetate (AcOEt), the organic phases are dried over MgSO<sub>4</sub> and then concentrated on a rotary

evaporator to give 4 g of the expected product in the form of a yellow oil.

- Yield: 85%
- $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.25 (s, 9H); 2.50 (m, 2H); 3.05 (m, 2H); 3.45 (m, 2H); 5.40 (broad s, 1H).

**A-2 - Synthesis of N-BOC-3-aminopropanal (Compound 2)**

18 g (103 mmol) of Compound 1, 1.62 g (10.4 mmol) of TEMPO (tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical), 2.9 g (10.45 mmol) of tetrabutylammonium chloride and 21 g (75.5 mmol) of N-chlorosuccinimide are suspended in 351 ml of  $\text{NaHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.5N/0.05N) and 351 ml of  $\text{CHCl}_3$ . The reaction mixture is vigorously stirred for 2 hours. The organic phase is separated by settling, dried over  $\text{MgSO}_4$  and then concentrated on a rotary evaporator to give the expected aldehyde in the form of a light orange oil.

- Yield: 100%
- $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.35 (s, 9H); 2.44 (d, 2H,  $J = 6.8$  Hz); 3.21 (m, 2H); 4.90 (broad s, 1H); 6.04 (dd, 1H,  $J = 8$  and 15.6 Hz); 6.74 (td, 1H,  $J = 6.8$  and 15.6 Hz); 9.39 (d, 1H,  $J = 8$  Hz).

**A-3 - Synthesis of N-BOC-5-amino-2-penten-1-al (Compound 3)**

11 g (66.7 mmol) of Compound 2 and 24.3 g (80 mmol) of formylmethylenetriphenylphosphorane (FMTP) are dissolved in 350 ml of benzene and then the reaction mixture is brought to reflux for 9 hours. After evaporating the solvent on a rotary evaporator, the residue is filtered a first time through silica [(1/1  $\text{CHCl}_3$ /heptane) then  $\text{CHCl}_3$ ] to remove the triphenylphosphine. A second filtration through silica (8/2 AcOEt/heptane) makes it possible to obtain 3.88 g of Compound 3 in the form of an orange-yellow oil.

- Yield: 29%
- $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.47 (s, 9H); 2.60 (m, 2H); 3.38 (m, 2H); 4.82 (broad s, 1H); 6.18 (dd, 1H); 6.88 (td, 1H); 9.55 (d, 1H).

**A-4 - Synthesis of N-BOC-5-amino-2-penten-1-al dimethylhydrazone (Compound 4)**

3.88 g (19.5 mmol) of Compound 3 are added at 0°C to 1.47 ml (19.5 mmol) of dimethylhydrazine and 8 drops of acetic acid in 30 ml of ether. The reaction mixture is left stirring for 10 min and the organic phase is separated by settling and washed with 1N HCl and then with a saturated NaCl solution. After drying over MgSO<sub>4</sub> and evaporating the solvent on a rotary evaporator, 4.4 g of hydrazone (Compound 4) are obtained in the form of an orange-yellow oil.

- Yield: 94%
- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.30 (s, 9H); 2.3 (m, 2H); 2.82 (m, 2H); 4.52 (broad s, 1H); 5.70 (td, 1H, J = 6.8 and 15.6 Hz); 6.22 (ddd, 1H, J = 0.8 and 8.8 and 15.6 Hz); 6.96 (d, 1H, J = 8.8 Hz).
- <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 28.15; 33.05; 39.58; 42.51; 78.77; 130.84; 130.95; 135.54; 155.68.

**B - Preparation of the compounds of formula II and IIa**

**B-1: Synthesis of 4-methylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione (Intermediate I-1b) and of 4-methylpyrido-[3,2-g]quinoline-5,10-dione (Intermediate II-1b)**

A mixture of 0.5 g (3.14 mmol) of quinoline-5,8-dione, 0.35 g (3.14 mmol) of crotonaldehyde dimethylhydrazone and 0.45 ml (4.76 mmol) of acetic anhydride in 20 ml of CHCl<sub>3</sub> are treated in an ultrasonic bath for 1 hour. After evaporating the solvent on a rotary evaporator, the reaction mixture is filtered through silica (CHCl<sub>3</sub>) to give 0.428 g of a mixture of the two isomers I-1a and II-1a in the form of a purple powder. This powder and 1.6 g (18.4 mmol) of MnO<sub>2</sub> are suspended in 20 ml of CHCl<sub>3</sub> and the mixture is brought to reflux for 2 hours. After filtering through celite, the filtrate is concentrated on a rotary evaporator and then purified by flash chromatography on a silica column (98/2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to give:

**Intermediate (I-1b): 4-methylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione**

- 40 mg (Yield: 6%) in the form of a brown powder.
- Melting point: 220°C.
- 5 •  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.91 (s, 3H); 7.54 (d, 1H,  $J$  = 4.8 Hz); 7.75 (dd, 1H,  $J$  = 4 and 7.6 Hz); 8.67 (dd, 1H,  $J$  = 2 and 7.6 Hz); 8.91 (d, 1H,  $J$  = 4.8 Hz); 9.12 (dd, 1H,  $J$  = 2 and 4 Hz).
- 10 •  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 22.75; 127.93; 128.04; 129.32; 131.50; 135.50; 148.73; 149.26; 152.11; 153.68; 155.47; 181.46; 182.87.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 1689  $\text{cm}^{-1}$ .

**Intermediate (II-1b): 4-methylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione**

- 15 • 160 mg (Yield: 23%) in the form of a brown powder.
- Melting point: 270°C.
- $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.94 (s, 3H); 7.52 (d, 1H,  $J$  = 4.8 Hz); 7.76 (dd, 1H,  $J$  = 4.8 and 8.4 Hz); 8.59 (dd, 1H,  $J$  = 2 and 8.4 Hz); 8.92 (d, 1H,  $J$  = 4.8 Hz); 9.11 (dd, 1H,  $J$  = 2 and 4.8 Hz).
- 20 •  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 22.81; 128.30; 128.39; 130.84; 131.55; 135.52; 147.90; 149.95; 151.74; 153.94; 155.35; 180.42; 184.02.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 1672; 1700.

25

**B-2: Synthesis of 9-methoxy-4-methylpyrido[2,3-g]-quinoline-5,10-dione (Intermediate I-2b) and of 6-methoxy-4-methylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione (Intermediate II-2b)**

- 30 A mixture of 0.5 g (2.8 mmol) of 4-methoxyquinoline-5,8-dione, 0.32 g (2.87 mmol) of crotonaldehyde dimethylhydrazone and 0.4 ml (4.23 mmol) of acetic anhydride in 8 ml of  $\text{CHCl}_3$  are brought to reflux for 1 hour. After evaporating the solvent on a rotary
- 35 evaporator, the reaction mixture is filtered through silica (98/2  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ) to give 0.48 g of a mixture of the two isomers I-2a and II-2a in the form of a purple powder. This powder and 2.3 g (26.45 mmol) of  $\text{MnO}_2$  are suspended in 26 ml of  $\text{CHCl}_3$  and the mixture is brought



to reflux for 2 hours. After filtering through celite, the filtrate is concentrated on a rotary evaporator and then purified by flash chromatography on a silica column (98/2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to give:

5 **Intermediate I-2b: 9-methoxy-4-methylpyrido[2,3-g]-quinoline-5,10-dione**

- 57 mg (Yield: 8%) in the form of a red powder.
- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.84 (s, 3H); 4.06 (s, 3H); 7.18 (d, 1H, J = 6 Hz); 7.46 (d, 1H, J = 4.4 Hz); 8.87 (d, 1H, J = 6 Hz); 8.87 (d, 1H, J = 4.4 Hz).

10

**Intermediate II-2b: 6-methoxy-4-methylpyrido[3,2-g]-quinoline-5,10-dione**

- 293 mg (Yield: 40%) in the form of an orange powder.
- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.80 (s, 3H); 4.05 (s, 3H); 7.2 (d, 1H, J = 6 Hz); 7.48 (d, 1H, J = 4.8 Hz); 8.85 (d, 1H, J = 6 Hz); 8.88 (d, 1H, J = 4.8 Hz).
- <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.75; 43.41; 112.74; 119.72; 130.93; 131.04; 148.32; 149.22; 150.26; 151.60; 152.80; 155.11; 181.44; 184.53.
- IR (CHCl<sub>3</sub>): 1675; 1700.

15

20

25

**B-3: Synthesis of 9-nitro-4-methylpyrido[2,3-g]-quinoline-5,10-dione (Intermediate I-5b) and of 6-nitro-4-methylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione (Intermediate II-5b)**

A mixture of 0.8 g (3.92 mmol) of 4-nitroquinoline-5,8-dione, 0.65 g (5.8 mmol) of crotonaldehyde dimethylhydrazone and 0.55 ml (5.8 mmol) of acetic anhydride in 10.5 ml of CHCl<sub>3</sub> are treated in an ultrasonic bath for 30 min. After evaporating the solvent on a rotary evaporator, the reaction mixture is filtered through silica (98/2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to give 0.7 g of a mixture of the two isomers I-5a and II-5a in the form of a purple powder. This powder and 2.9 g (33.4 mmol) of MnO<sub>2</sub> are suspended in 29 ml of CHCl<sub>3</sub> and the mixture is brought to reflux for 2 hours. After filtering through celite, the filtrate is concentrated on a rotary evaporator and then purified by flash

30

35

chromatography on a silica column (98/2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to give:

**Intermediate I-5b: 9-nitro-4-methylpyrido[2,3-g]-quinoline-5,10-dione**

- 5 • 110 mg (Yield: 11%) in the powder form.
- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.98 (s, 3H); 7.19 (d, 1H, J = 5.6 Hz); 7.54 (d, 1H, J = 4.8 Hz); 8.79 (d, 1H, J = 5.6 Hz); 8.94 (d, 1H, J = 4.8 Hz).
- IR (CHCl<sub>3</sub>): 1703.

10 **Intermediate II-5b: 6-nitro-4-methylpyrido[3,2-g]-quinoline-5,10-dione**

- 165 mg (Yield: 16%) in the form of a yellow-brown powder.
- 15 • <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.85 (s, 3H); 7.6 (d, 1H, J = 4.8 Hz); 7.74 (d, 1H, J = 4.8 Hz); 8.99 (d, 1H, J = 4.8 Hz); 9.33 (d, 1H, J = 4.8 Hz).

**B-4: Synthesis of 6-dimethylamino-4-methylpyrido-[3,2-g]quinoline-5,10-dione (Intermediate II-3b)**

20 150 mg (0.558 mmol) of nitrated tricycle II-5a (preparation section B-3) and 0.4 ml (1.95 mmol) of N,N-dimethylformamide diethyl acetal are dissolved in 2.1 ml of DMF and the reaction mixture is heated at 130°C for 1 hour. After evaporating the solvent with a

25 vacuum pump, 140 mg of intermediate compound II-3b are obtained, which material will be used as is in the following stage.

- Yield: 94%.
- 30 • <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.77 (s, 3H); 3.05 (s, 6H); 6.89 (d, 1H, J = 6 Hz); 7.39 (d, 1H, J = 4.8 Hz); 8.42 (d, 1H, J = 6 Hz); 8.74 (d, 1H, J = 4.8 Hz).

**B-5: Synthesis of 9-chloro-4-(N-BOC-1-aminoethane)-5,10-dihydropyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione (Intermediate I-7b) and of 6-chloro-4-(N-BOC-1-aminoethane)-5,10-dihydropyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione (Intermediate II-7b)**

35

A mixture of 0.6 g (3.1 mmol) of 4-chloroquinoline-5,8-dione, 0.75 g (3.1 mmol) of dimethylhydrazone 4 and

0.45 ml (4.76 mmol) of acetic anhydride in 8.5 ml of  $\text{CHCl}_3$  are treated in an ultrasonic bath for 30 min. After evaporating the solvent on a rotary evaporator, 2.7 g (31.1 mmol) of  $\text{MnO}_2$  and 22 ml of  $\text{CHCl}_3$  are added to the reaction mixture, which is brought to reflux for 2 hours. After filtering through celite, the filtrate is concentrated on a rotary evaporator and then purified by flash chromatography on a silica column (99/1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ) to give:

10 **Intermediate I-7b: 9-chloro-4-(N-BOC-1-aminoethane)-5,10-dihydropyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione:**

- 70 mg (Yield: 6%) in the form of a brown powder.
- $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.35 (s, 9H); 3.45-3.52 (m, 4H); 4.86 (broad s, 1H); 7.56 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz); 7.74 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 8.90 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 8.94 (d, 1H,  $J = 4$  Hz).
- $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 28.37; 35.32; 40.30; 79.47; 126.84; 128.04; 130.88; 131.17; 145.78; 150.34; 150.98; 152.29; 154.05; 154.36; 155.88; 179.76; 182.32.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 1695.

20 **Intermediate II-7b: 6-chloro-4-(N-BOC-1-aminoethane)-5,10-dihydropyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione**

- 200 mg (Yield: 17%) in the form of a brown powder.
- $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 28.24; 34.96; 40.33; 79.47; 128.46; 130.15; 131.06; 131.59; 145.20; 148.76; 149.71; 151.74; 153.88; 153.92; 155.84; 179.76; 183.20.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 1705.

- 30
- **B-6: Synthesis of 3-methoxy-4-methylpyrido[2,3-g]quinoline-5,10-dione (I-8b) and of 3-methoxy-4-methylpyrido[3,2-g]quinoline-5,10-dione (II-8b)**

35 A mixture of 1 g (6.28 mmol) of quinoline-5,8-dione and 1.78 g (12.57 mmol) of 2-methoxy-2-butenal dimethylhydrazone in 25 ml of  $\text{CHCl}_3$  are stirred at ambient temperature for 5 hours. After evaporating the solvent on a rotary evaporator, the reaction mixture is

filtered through silica (95/5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to give 1.55 g of a mixture of the two isomers I-8a and II-8a in the form of a purple powder. This powder and 1 g (11.5 mmol) of MnO<sub>2</sub> are suspended in 30 ml of CHCl<sub>3</sub> and the mixture is stirred at ambient temperature for 1 hour. After filtering through celite, the filtrate is concentrated on a rotary evaporator and then purified by flash chromatography on a silica column (99/1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to give:

10 **Intermediate I-8b: 3-methoxy-4-methylpyrido[2,3-g]-quinoline-5,10-dione**

- 110 mg (Yield: 7%) in the form of a brown powder.
- Melting point: >260°C.
- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.79 (s, 3H); 4.11 (s, 3H); 7.72 (dd, 1H, J = 4.8 and 8.1 Hz); 8.66 (s, 1H); 8.67 (dd, 1H, J = 8.1 and 1.9 Hz); 9.10 (dd, 1H, J = 4.8 and 1.9 Hz).
- <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 13.03; 56.87; 127.88; 129.50; 129.95; 135.50; 136.64; 139.26; 142.56; 149.33; 155.11; 157.24; 180.63; 183.56.
- IR (CHCl<sub>3</sub>): 1684.

20 **Intermediate II-8b: 3-methoxy-4-methylpyrido[3,2-g]-quinoline-5,10-dione**

- 190 mg (Yield: 12%) in the form of a brown powder.
- Melting point: >260°C.
- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.77 (s, 3H); 4.12 (s, 3H); 7.74 (dd, 1H, J = 4.6 and 8.0 Hz); 7.60 (dd, 1H, J = 8.0 and 1.6 Hz); 8.68 (s, 1H); 9.12 (dd, 1H, J = 4.6 and 1.6 Hz).
- <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 12.98; 56.93; 127.99; 129.06; 131.27; 135.53; 136.84; 138.81; 143.27; 148.16; 155.20; 157.16; 179.69; 184.59.
- IR (CHCl<sub>3</sub>): 1670; 1692.

35 **EXAMPLE 1**

**7H-Pyrido[4,3,2-de][1,10]phenanthroline-7-one  
(CRL 8293)**

63 mg (2.81 mmol) of compound I-b and 1.7 ml (9.84 mmol) of dimethylformamide diethyl acetal in

4.5 ml of DMF are brought to 120°C, under nitrogen, for 1 hour. After evaporating the solvent with a vacuum pump, 3.5 g (65 mmol) of NH<sub>4</sub>Cl and 60 ml of absolute ethanol are added. The reaction mixture is brought to reflux for 30 min. After evaporating the ethanol on a rotary evaporator, 50 ml of water are added to the residue and extraction is carried out with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 times 50 ml). After drying the organic phases over MgSO<sub>4</sub> and evaporating the solvent on a rotary evaporator, 0.6 g of tetracycle are obtained in the form of a greenish powder.

- Yield: 90%.
- Melting point: 240°C.
- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 7.68 (dd, 1H, J = 4.4 and 8 Hz); 7.87 (d, 1H, J = 5.6 Hz); 8.02 (d, 1H, J = 5.2 Hz); 8.77 (dd, 1H, J = 1.6 and 8 Hz); 9.11 (d, 1H, J = 5.2 Hz); 9.16 (dd, 1H, J = 1.6 and 4.4 Hz); 9.19 (d, 1H, J = 5.6 Hz).
- <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 120.95; 124.40; 126.14; 129.32; 136.78; 139.09; 147.45; 148.58; 148.82; 148.96; 150.66; 152.00; 155.73; 181.96.

#### **EXAMPLE 2:**

**7H-Pyrido[4,3,2-de][1,7]phenanthroline-7-one (CRL 8294)**  
0.87 g (3.88 mmol) of compound II-1b and 2.5 ml (14.7 mmol) of dimethylformamide diethyl acetal in 6.1 ml of DMF are brought to 120°C, under nitrogen, for 1 hour. After evaporating the solvent with a vacuum pump, 4.9 g (91 mmol) of NH<sub>4</sub>Cl and 780 ml of absolute ethanol are added. The reaction mixture is brought to reflux for 30 min. After evaporating the ethanol on a rotary evaporator, 50 ml of water are added to the residue and extraction is carried out with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 times 50 ml). After drying the organic phases over MgSO<sub>4</sub> and evaporating the solvent on a rotary evaporator, 0.72 g of tetracycle are obtained in the form of a yellow powder.

- Yield: 80%.

- $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.76 (dd, 1H,  $J = 4.4$  and 8 Hz); 7.80 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 7.99 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz); 8.93 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz); 9.05 (dd, 1H,  $J = 1.6$  and 4.4 Hz); 9.17 (dd, 1H,  $J = 1.6$  and 8 Hz); 9.19 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz).
- $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 119.39; 120.01; 123.85; 128.15; 132.87; 133.80; 138.65; 147.54; 147.74; 148.93; 149.49; 149.99; 152.97; 180.73.

10 **EXAMPLE 3**

**8-Methoxy-7H-pyrido[4,3,2-de][1,10]phenanthroline-7-one (CRL 8363)**

0.74 g (2.92 mmol) of compound I-2b and 2 ml (11.8 mmol) of dimethylformamide diethyl acetal in 5.2 ml of DMF are brought to  $120^\circ\text{C}$ , under nitrogen, for 1 hour. After evaporating the solvent with a vacuum pump, 4.5 g (83.6 mmol) of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 67 ml of absolute ethanol are added. The reaction mixture is brought to reflux for 30 min. After evaporating the ethanol on a rotary evaporator, 50 ml of water are added to the residue and extraction is carried out with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 times 50 ml). After drying the organic phases over  $\text{MgSO}_4$  and evaporating the solvent on a rotary evaporator, the residue is purified by flash chromatography on a silica column (98/2  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) to give 0.28 g of tetracycle in the form of an orange powder.

- Yield: 37%.
- $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 4.20 (s, 3H); 7.13 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz); 7.82 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 7.94 (d, 1H,  $J = 6$  Hz); 8.92 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz); 9.07 (d, 1H,  $J = 6$  Hz); 9.13 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 9.19 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz).
- $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 56.77; 109.26; 119.70; 120.47; 123.09; 138.50; 147.85; 148.25; 148.69; 150.66; 154.08; 155.68; 167.54; 180.40.

**EXAMPLE 4:**

**11-Methoxy-7H-pyrido[4,3,2-de][1,7]phenanthroline-7-one  
(CRL 8364)**

1.14 g (4.48 mmol) of compound II-2b and 3 ml  
5 (14.7 mmol) of dimethylformamide diethyl acetal in 8 ml  
of DMF are brought to 120°C, under nitrogen, for  
1 hour. After evaporating the solvent with a vacuum  
pump, 4.5 g (83.6 mmol) of NH<sub>4</sub>Cl and 67 ml of absolute  
ethanol are added. The reaction mixture is brought to  
10 reflux for 30 min. After evaporating the ethanol on a  
rotary evaporator, 50 ml of water are added to the  
residue and extraction is carried out with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
(3 times 50 ml). After drying the organic phases over  
MgSO<sub>4</sub> and evaporating the solvent on a rotary  
15 evaporator, the residue is purified by flash  
chromatography on a silica column (98/2 CHCl<sub>3</sub>/MeOH) to  
give 0.59 g of tetracycle in the form of a yellow  
powder.

- Yield: 50%.
- 20 • <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 4.15 (s, 3H); 7.26 (d, 1H, J =  
6 Hz); 7.70 (d, 1H, J = 6 Hz); 7.96 (d, 1H, J =  
5.6 Hz); 8.85 (d, 1H, J = 6 Hz); 8.97 (d, 1H, J =  
6 Hz); 9.15 (d, 1H, J = 5.6 Hz).
- <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 57.05; 111.33; 118.72; 119.61;  
25 122.12; 124.29; 138.56; 146.71; 147.10; 148.69;  
149.81; 150.96; 153.13; 165.83; 180.82.

**EXAMPLE 5**

**11-(Dimethylamino)-7H-pyrido[4,3,2-de][1,7]-  
30 phenanthroline-7-one (CRL 8367)**

80 mg (0.3 mmol) of tricycle II-3b and 0.21 ml  
(1.05 mmol) of dimethylformamide diethyl acetal in  
1.2 ml of DMF are brought to 120°C, under nitrogen, for  
1 hour. After evaporating the solvent with a vacuum  
35 pump, 0.5 g (9.3 mmol) of NH<sub>4</sub>Cl and 80 ml of absolute  
ethanol are added. The reaction mixture is brought to  
reflux for 40 min. After evaporating the ethanol on a  
rotary evaporator, 5 ml of water are added to the  
residue and extraction is carried out with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3

times 5 ml). After drying the organic phases over  $\text{MgSO}_4$  and evaporating the solvent on a rotary evaporator, the tetracycle is obtained in the form of a red powder.

- Yield: 100%

5 •  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 3.00 (s, 6H); 7.09 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 7.57 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz); 7.90 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 8.54 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 8.89 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 9.11 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz).

10 **EXAMPLE 6**

**11-Hydroxy-7H-pyrido[4,3,2-de][1,7]phenanthroline-7-one (CRL 8388)**

50 mg (0.126 mmol) of tricycle II-7b are dissolved in 0.5 ml of TFA and then the reaction mixture is stirred  
15 for 24 hours. The TFA is evaporated on a rotary evaporator and then a saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution is added until a pH of 9-10 is obtained. The mixture is extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 times 3 ml). After drying over  $\text{MgSO}_4$  and evaporating the solvent on a rotary  
20 evaporator, 20 mg of tetracycle are obtained in the form of a yellow powder.

- Yield: 62%.

- Melting point:  $> 260^\circ\text{C}$ .

25 •  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.20 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz); 7.83 (d, 1H,  $J = 6$  Hz); 8.00 (d, 1H,  $J = 6$  Hz); 8.72 (d, 1H,  $J = 6$  Hz); 8.76 (d, 1H,  $J = 6$  Hz); 9.24 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz), 14.65 (s, 1H).

30 •  $^{13}\text{C}$  NMR ( $d_6$ -DMSO): 116.22; 116.35; 118.61; 120.24; 124.06; 138.09; 143.61; 148.04; 148.99; 149.41; 152.61; 153.01; 165.80; 179.55.

**EXAMPLE 7**

**8-Chloro-7H-pyrido[4,3,2-de][1,10]phenanthroline-7-one (CRL 8396)**

35 260 mg (0.67 mmol) of tricycle I-7b are dissolved in 2.6 ml of TFA and then the reaction mixture is stirred for 64 hours. The TFA is evaporated on a rotary evaporator and then 200 ml of 95/5  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  are added, followed by a saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution until a



pH of 10 is obtained. The organic phase is recovered and is washed with water. After drying over  $\text{MgSO}_4$  and evaporating the solvent on a rotary evaporator, 40 mg of tetracycle are obtained in the form of a brown powder which is washed with ether.

- Yield: 28%.
- Melting point:  $> 260^\circ\text{C}$ .
- $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.68 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 7.89 (d, 1H,  $J = 5.5$  Hz); 8.01 (d, 1H,  $J = 5.5$  Hz); 8.96 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz); 9.14 (d, 1H,  $J = 5.5$  Hz); 9.19 (d, 1H,  $J = 5.5$  Hz).
- $^{13}\text{C}$  NMR ( $d_6$ -DMSO): 119.87; 120.88; 123.61; 126.31; 129.01; 138.56; 146.87; 147.37; 148.46; 148.94; 149.76; 153.85; 153.96; 179.87.

#### EXAMPLE 8

##### **4-Methoxy-7H-pyrido[4,3,2-de][1,10]phenanthroline-7-one (CRL 8400)**

0.1 g (0.39 mmol) of tricycle I-8b and 0.27 ml (1.37 mmol) of dimethylformamide diethyl acetal in 0.7 ml of DMF are brought to  $120^\circ\text{C}$ , under nitrogen, for 1 hour. After evaporating the solvent with a vacuum pump, 0.6 g (11.7 mmol) of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 90 ml of absolute ethanol are added. The reaction mixture is brought to reflux for 30 min. After evaporating the ethanol on a rotary evaporator, 10 ml of water are added to the residue and extraction is carried out with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 times 10 ml). After drying the organic phases over  $\text{MgSO}_4$ , evaporating the solvent on a rotary evaporator and purifying by filtration through silica (95/5  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ), 85 mg of tetracycle are obtained in the form of a brown powder.

- Yield: 83% (85 mg).
- Melting point:  $> 260^\circ\text{C}$ .
- $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 4.27 (s, 3H); 7.65 (dd, 1H,  $J = 4.8$  and 8 Hz); 8.15 (d, 1H,  $J = 6$  Hz); 8.70 (s, 1H); 8.78 (dd, 1H,  $J = 8$  and 1.9 Hz); 9.10 (d, 1H,  $J = 6$  Hz); 9.13 (dd, 1H,  $J = 1.9$  and 4.8 Hz).

- $^{13}\text{C}$  NMR ( $d_6$ -DMSO): 56.97; 115.63; 120.81; 125.52; 129.02; 129.16; 130.22; 136.24; 139.81; 147.37; 149.31; 151.65; 153.07; 154.81; 180.34.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 1674.

5

**EXAMPLE 9:**

**4-Methoxy-7H-pyrido[4,3,2-de][1,7]phenanthroline-7-one  
(CRL 8401)**

0.1 g (0.39 mmol) of tricycle II-8b and 0.27 ml  
10 (1.37 mmol) of dimethylformamide diethyl acetal in  
0.7 ml of DMF are brought to 120°C, under nitrogen, for  
1 hour. After evaporating the solvent with a vacuum  
pump, 0.6 g (11.7 mmol) of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 90 ml of absolute  
ethanol are added. The reaction mixture is brought to  
15 reflux for 30 min. After evaporating the ethanol on a  
rotary evaporator, 10 ml of water are added to the  
residue and extraction is carried out with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   
(3 times 10 ml). After drying the organic phases  
over  $\text{MgSO}_4$ , evaporating the solvent on a rotary  
20 evaporator and purifying by filtration through silica  
(98/2  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ), 60 mg of tetracycle are obtained in  
the form of a yellow-brown powder.

- Yield: 59%.
- Melting point: > 260°C.
- 25 •  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 4.27 (s, 3H); 7.74 (dd, 1H,  $J = 4.4$   
and 8.1 Hz); 8.08 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz); 8.72 (s,  
1H); 8.93 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz); 9.05 (dd, 1H,  $J =$   
1.9 and 4.4 Hz); 9.19 (dd, 1H,  $J = 1.9$  and  
8.1 Hz).
- 30 •  $^{13}\text{C}$  NMR ( $d_6$ -DMSO): 57.03; 115.16; 119.70; 127.69;  
129.48; 130.15; 132.86; 133.74; 140.82; 146.80;  
147.98; 148.63; 152.81; 152.98; 179.84.
- IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 1679.

35 The results of the *in vitro* and *in vivo* pharmacological  
tests, presented below, demonstrate the cytotoxic  
properties of the compounds of formula (I) and (Ia) and  
the maximum tolerated doses (MTD).

# 1 - Cytotoxic activity on tumour cell lines in culture (MTT test)

The influence of the compounds of formula (I) and of (Ia) on tumour cells was evaluated using the MTT colorimetric test (T. Mosman, J. Immunol. Methods, 1983; 65: 55-63, J. Carmichael et al., Cancer Res. 1987; 47: 936-942).

The principle of the MTT test is based on the mitochondrial reduction by metabolically active cells of the yellow-coloured product MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to a blue-coloured product, formazan. The amount of formazan thus obtained is directly proportional to the amount of live cells present in the culture well or wells. This amount of formazan is measured by spectrophotometry.

The cell lines are maintained in monolayer culture at 37°C in stoppered culture dishes containing 25 MM HEPES MEM (Minimum Essential Medium) base medium. This medium is well suited to the growth of a range of varied diploid or primary mammalian cells. This medium is subsequently supplemented:

- with an amount of 5% of FCS (Foetal Calf Serum) decompemented at 56°C for 1 hour,
- with 0.6 mg/ml of L-glutamine,
- with 200 IU/ml of penicillin,
- with 200 µg/ml of streptomycin,
- with 0.1 mg/ml of gentamicin.

The 12 human cancer cell lines which were used were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). These 12 cell lines are:

- U-373MG (ATCC code: HTB-17) and U-87MG (ATCC code: HTB-14), which are two glioblastomas,
- SW1088 (ATCC code: HTB-12) which is an astrocytoma,
- A549 (ATCC code: CCL-185) and A-427 (ATCC code: HTB-53), which are two non-small-cell lung cancers,

- HCT-15 (ATCC code: CCL-225) and LoVo (ATCC code: CCL-229), which are two colorectal cancers,  
- T-47D (ATCC code: HTB-133) and MCF7 (ATCC code: HTB-22), which are two breast cancers,  
5 - J82 (ATCC code: HTB-1) and T24 (ATCC code: HPB-4), which are two bladder cancers,  
- PC-3 (ATCC code: CRL-1435), which is a prostate cancer.

10 Experimentally: 100  $\mu$ l of a cell suspension comprising 20 000 to 50 000 (depending on the cell type used) cells/ml of culture medium are inoculated in flat-bottomed 96-well multi-well plates and are incubated at 37°C under an atmosphere comprising 5% of CO<sub>2</sub> and 70%  
15 humidity. After incubating for 24 hours, the culture medium is replaced with 100  $\mu$ l of fresh medium comprising either the various test compounds at concentrations varying from 10<sup>-5</sup> to 10<sup>-10</sup> M of the solvent used to dissolve the test products (control  
20 condition). After incubating for 72 hours under the above conditions, the culture medium is replaced with 100  $\mu$ l of a yellowish solution of MTT dissolved, in a proportion of 1 mg/ml, in RPMI 1640. The microplates are reincubated for 3 hours at 37°C and then  
25 centrifuged for 10 minutes at 400 g. The yellowish MTT solution is removed and the blue formazan crystals formed at the cellular level are dissolved in 100  $\mu$ l of DMSO. The microplates are subsequently agitated for 5 minutes. The intensity of the resulting blue  
30 coloration, and thus of the conversion of the yellow MTT product into blue formazan by the cells which are still alive at the end of the experiment, is quantified by spectrophotometry using a device of DYNATECH IMMUNOASSAY SYSTEM type at wavelengths of 570 nm and  
35 630 nm corresponding respectively to the maximum absorption wavelengths of formazan and to the background noise. Software built into the spectrophotometer calculates the mean optical density

values and the standard deviation (Std. Dev.) and standard error of the mean (SEM) values.

5 The inhibitory activity on the cell growth of the compounds of formula (I) and (Ia) on the various tumour cell lines was measured in comparison with that of the natural product. By way of example, the values of the concentrations framing the 50% inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) obtained for each compound are  
10 presented in Table I below:

TABLE 1

CELL LINES	COMPOUNDS (concentration : mol.l <sup>-1</sup> )								
	CRL8293	CRL8294	CRL8363	CRL8364	CRL8367	CRL8388	CRL8396	CRL8400	CRL8401
U-87MG	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
U-373MG	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
SW1088	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
T24	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
J82	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]
HCT-15	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
LoVo	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]
MCF7	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
T-47D	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]
A549	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
A-427	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]
PC-3	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	> 10 <sup>-5</sup>	[10 <sup>-5</sup> ,10 <sup>-6</sup> ]	[10 <sup>-6</sup> ,10 <sup>-7</sup> ]	[10 <sup>-7</sup> ,10 <sup>-8</sup> ]

All of the compounds studied exhibit significant inhibitory activity on the cell proliferation of the 12 human tumour lines: U-87MG, U-373MG, SW 1088, T24, J82, HCT-15, LoVo, MCF7, T-47D, A549, A-427 and PC-3, with an IC<sub>50</sub> which can be between 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-8</sup> M, depending on the compounds and the tumour lines tested.

## 10 2 - Determination of the maximum tolerated dose (MTD)

The evaluation of the maximum tolerated dose was carried out on B6D2F1/Jico mice aged from 4 to 6 weeks.

The compounds were administered intraperitoneally at increasing doses ranging from 2.5 to 160 mg/kg. The value of the MTD (expressed in mg/kg) is determined from the observation of the survival rates of the animals over a period of 14 days after a single administration of the product under consideration. The change in the weight of the animals is also monitored over this period. When that the value of the MTD is greater than 160 mg/kg, the value of the MTD is categorized as 160 mg/kg by default.

The results of the assessment of the maximum tolerated dose (MTD) are collated in the following Table II:

TABLE 2

Maximum Tolerated Doses

CRL Compounds	DMT (mg/kg)
CRL 8388 (Example 6)	10
CRL 8293 (Example 1)	10
CRL 8294 (Example 2)	10
CRL 8363 (Example 3)	10
CRL 8364 (Example 4)	5
CRL 8367 (Example 5)	10
CRL 8396 (Example 7)	20
CRL 8400 (Example 8)	> 160
CRL 8401 (Example 9)	> 160

The products of this family exhibit either a degree of direct toxicity or may be devoid of it and may then be used *in vivo* at high tissue concentrations and therefore at high dosages.

### 3 - *in vivo* Antitumour activity

The tests were carried out on models of:

- hormone-insensitive mouse mammary carcinoma MXT (HI-MXT),
- hormone-sensitive mouse mammary adenocarcinoma MXT (HS-MXT),

- lymphoma L 1210.

The model of mouse mammary adenocarcinoma MXT of Watson C. et al. (Cancer Res., 1977; 37: 3344-48),  
5 grafted onto B6D2F1/Jico mice aged from 4 to 6 weeks, is derived from the mammary gland milk ducts. Initially hormone-sensitive (HS-MXT model), the differentiated tumour develops in the direction of an undifferentiated hormone-insensitive tumour (HI-MXT model). The agents  
10 with the antitumour activity which has been demonstrated clinically prolong the survival of the animals carrying HI-MXT tumours and HS-MXT tumours. This is the case, for example, with cyclophosphamide, etoposide or adriamycin.

15 The model of lymphoma L 1210 is a model of L 1210 leukemia cells of mouse origin grafted subcutaneously in the mouse. They give rise, in 100% of cases, to a rapid-growth subcutaneous solid tumour (L 1210 s.c.).

20 When the MTD value of a product was determined, its *in vivo* antitumour activity was characterized at the MTD/2, MTD/4 and MTD/8 doses on the models of mammary adenocarcinoma of mouse origin HS-MXT and of mouse  
25 mammary carcinoma HI-MXT and on the model of subcutaneous lymphoma L 1210.

In all the examples presented below, whatever the model, the control condition is represented by a batch  
30 of 9 or 15 mice to which is administered, for 3 consecutive weeks and at the rate of 3 administrations (Monday, Wednesday and Friday) per week, a volume of 0.2 ml of physiological saline comprising the solvent used to dissolve the various  
35 compounds of formula (I) and (Ia) used.

During these tests, either the tumour growth or the survival rate of the mice were determined:



i)- The tumour growth was evaluated by measuring twice weekly (Monday and Friday) the area of the grafted HS-MXT, HI-MXT or L 1210 tumours. This area is calculated by multiplying the value of the two greatest perpendicular axes of the tumour. The value of these axes is measured using a sliding caliper.

ii)- The survival rate of the mice is calculated in the form of a ratio T/C, where:

$$T = \frac{\text{(Number of days of survival of the median mouse of the batch of mice treated)} \times \text{(Median mouse treated)}}{\text{(Number of dead mice on the same day as the median mouse treated)} + \text{(Number of dead mice in the days which preceded that of the median mouse treated)}}$$

$$C = \frac{\text{(Number of days of survival of the median mouse of the batch of mice treated)} \times \text{(Median mouse treated)}}{\text{(Number of dead mice on the same day as the median mouse)} + \text{(Number of dead mice in the days which preceded that of the median mouse treated)}}$$

10

This ratio represents the mean survival time of the mean mouse of the batch of treated mice with respect to the mean survival time of the median mouse of the batch of control mice. Thus, a molecule induces a significant (P < 0.05) increase in the survival of the animals when the T/C index exceeds 130%. On the other hand, it has a toxic effect when this T/C value is less than 70%.

### 3.1.- Mouse mammary carcinoma (HI-MXT)

20 The influence of the two products CRL 8293 and CRL 8294 on the growth of HI-MXT tumours will be presented below by way of example. Each batch of mice grafted with

HI-MXT tumours relating to a given experimental condition comprises 15 animals.

Treatment 1

5 The product CRL 8293 is administered intraperitoneally. The first injection of the product is carried out on the seventh day postgrafting (D7) at the rate of 3 injections per week (Monday, Wednesday and Friday) for 3 consecutive weeks and at a dose of 5 mg/kg.

10

Treatment 2

The product CRL 8294 is administered intraperitoneally. The first injection of the product is carried out on the seventh day postgrafting (D7) at the rate of 3 injections per week (Monday, Wednesday and Friday) for 3 consecutive weeks and at a dose of 5 mg/kg.

15

The decreases (-) or the increases (+) in the area of the HI-MXT tumours induced with treatments 1 and 2 with respect to the control condition on the 21st day after the tumour grafting, i.e. after 6 administrations of the product CRL 8293 or of the product CRL 8294, are shown, as percentage, in the following Table II. 100% of the control animals are still alive on the 21st day postgrafting.

20

25

TABLE III

Treatments	Tumour area (expressed as %)
1 (CRL 8293)	-33
2 (CRL 8294)	-36

30 These results show that these two products CRL 8293 and CRL 8294 induce a significant decrease in the growth of the HI-MXT tumours. These results show that these products of formula I and Ia exhibit, in vivo and on this model, an advantageous antitumour activity.

35

3.2.- Mouse mammary adenocarcinoma (HS-MXT)

The influence of the two products CRL 8293 and CRL 8294 on the growth of HS-MXT tumours will be presented below by way of example. Each batch of mice grafted with the HS-MXT tumours relating to a given experimental condition comprises 9 animals.

Treatment 10

The product CRL 8293 is administered intraperitoneally. The first injection of the product is carried out on the seventh day postgrafting (D7) at the rate of 3 injections per week (Monday, Wednesday and Friday) for 3 consecutive weeks and at a dose of 5 mg/kg.

Treatment 20

The product CRL 8294 is administered alone by the intraperitoneal route. The first injection of the product is carried out on the seventh day postgrafting (D7) at the rate of 3 injections per week (Monday, Wednesday and Friday) for 3 consecutive weeks and at a dose of 5 mg/kg.

The decreases (-) or the increases (+) in the area of the HS-MXT tumours induced with treatments 10 and 20 with respect to the control condition on the 31st day after the tumour grafting, i.e. after the 9 administrations provided in the experimental protocol of the 2 products CRL 8293 and CRL 8294, are shown, as percentage, in the following Table IV. 100% of the control animals are still alive on the 31st day postgrafting.

TABLE IV

Treatments	Tumour area (expressed as %)
10 (CRL 8293)	-45
20 (CRL 8294)	-64

These results show that these two products CRL 8293 and CRL 8294 induce a very highly significant decrease in

the growth of the HS-MXT tumours. These results show, as on the HI-MXT model, that the products of formula I and Ia also exhibit on the HS-MXT model a highly advantageous antitumour activity.

5

### 3.3.- Lymphoma L 1210

The influence of CRL 8294 on the survival time of the mice will be presented below by way of example (Table V). Each batch of mice grafted with the lymphoma L 1210 relating to a given experimental condition comprises 9 animals.

10

#### Treatment 100

The product CRL 8294 is administered alone intraperitoneally. The first injection of the product is carried out on the seventh day postgrafting (D7) at the rate of 3 injections per week (Monday, Wednesday and Friday) for 3 consecutive weeks and at a dose of 1.25 mg/kg.

15

20

Table V

Treatment	T/C (expressed as %)
100 (CRL 8294)	136

The compound CRL 8294 of formula (I) exhibits an antitumour activity on the model of subcutaneous lymphoma L 1210. This activity is characterized by a significant extension of the mean survival time of the median mouse of the batch of mice thus treated with respect to the mean survival time of the median mouse of the batch of control mice.

25

30

### 4- Tolerance/cytotoxic activity ratios

The results of the mean IC<sub>50</sub> values (in nM) (calculated from the individual cytotoxic activities obtained on each of the 12 tumour lines studied) and the MTD/IC<sub>50</sub> ratios, calculated by taking the ratio of the MTD values to the IC<sub>50</sub> values, are presented in the

35

following Table VI. The MTD/IC<sub>50</sub> ratio is expressed as a dimensionless number.

TABLE VI

CRL Compounds	IC <sub>50</sub> (nM)	MTD/IC <sub>50</sub>	MTD/IC <sub>50</sub> *
CRL 8388 (Example 6)	6200	0.0016	1
CRL 8293 (Example 1)	1250	0.008	5
CRL 8294 (Example 2)	1450	0.007	4.4
CRL 8363 (Example 3)	500	0.02	12.5
CRL 8364 (Example 4)	270	0.019	12
CRL 8367 (Example 5)	1650	0.006	3.8
CRL 8396 (Example 7)	600	0.033	20.6
CRL 8400 (Example 8)	380	0.42	262
CRL 8401 (Example 9)	53	3	1875

\*: the MTD/IC<sub>50</sub> ratio of the various compounds was evaluated by taking, as reference, a ratio equal to 1 for CRL 8388.

- 10 The compounds of formula (I) and (Ia) exhibit significant antitumour activity both *in vitro* and *in vivo* under the experimental conditions described above. They inhibit, *in vitro*, the growth of tumour cells, as indicated by the results of the MTT colorimetric tests.
- 15 They significantly and greatly inhibit, *in vivo*, the growth of HI-MXT and HS-MXT tumours and significantly increase the mean survival time of the median mouse of the batch of mice thus treated and grafted with lymphoma L 1210 with respect to the mean survival time
- 20 of the median mouse of the batch of control mice.

By virtue of their cytotoxic properties, the compounds of formulae (I) and (Ia), as described or in the form of acceptable pharmaceutical salts or solvates, can be

25 used as active principles of medicaments.

The compounds of formulae (I) and (Ia) are generally administered in dosage units drawn up either per m<sup>2</sup> of body surface or per kg of weight. The said dosage units are preferably formulated in pharmaceutical compositions in which the active principle is mixed with one (or more) pharmaceutical excipient(s).

The compounds of formula (I) and (Ia) can be used, according to the cancer pathology of the subject to be treated, at doses of between 0.05 and 350 mg/m<sup>2</sup> of body surface, preferably at doses of 0.5 to 50 mg/m<sup>2</sup>/day for the curative treatment in its acute phase, as a function of the number of treatment cycles of each cure. For a maintenance treatment, the compounds of formulae I will advantageously be used at doses of 0.05 to 25 mg/m<sup>2</sup>/day, preferably at doses of 0.1 to 1.5 mg/m<sup>2</sup>/day, according to the number of treatment cycles of the cure. They may be used in combination with antitumour medicaments used in protocols validated for intensive polychemotherapy.

In the pharmaceutical compositions of the present invention for oral or intravenous administration, the active principles can be administered in unit administration forms, as a mixture with conventional pharmaceutical vehicles suitable for human therapeutics. The appropriate unit administration forms comprise forms to be taken orally, such as tablets, which may optionally be scored, or gelatin capsules, implants and intravenous administration forms.

For parenteral administration (intravenous infusion at a constant flow rate), use is made of sterile aqueous suspensions, sterile isotonic saline solutions or sterile and injectable solutions which comprise pharmacologically compatible dispersing agents and/or solubilizing agents, for example propylene glycol, polyethylene glycol or a  $\beta$ -cyclodextrin.

Thus, to prepare an aqueous solution for intravenous injection intended for an infusion carried out over 1 to 24 h, use may be made of a cosolvent: an alcohol, such as ethanol, or a glycol, such as polyethylene glycol or propylene glycol, and a hydrophilic surfactant, such as Tween 80.

When a solid composition in the form of tablets is prepared, a wetting agent, such as sodium lauryl sulphate, can be added to the micronized or unmiconized active principle, and the entire combination is mixed with a pharmaceutical vehicle, such as silica, gelatin, starch, lactose, magnesium stearate, talc, gum arabic or the like. The tablets can be coated with sucrose, with various polymers or with other appropriate materials while alternatively they can be treated so that they have a sustained or delayed activity and so that they continuously release a predetermined amount of active principle.

The preparation as gelatin capsules is obtained by mixing the active principle with a diluent, such as a glycol or a glycerol ester, and incorporating the mixture obtained in soft or hard gelatin capsules.

The active principle can also be formulated in the form of microcapsules or microspheres, optionally with one or more supports or additives.

The active principle can also be presented in the form of a complex with a cyclodextrin, for example  $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin or methyl- $\beta$ -cyclodextrin.

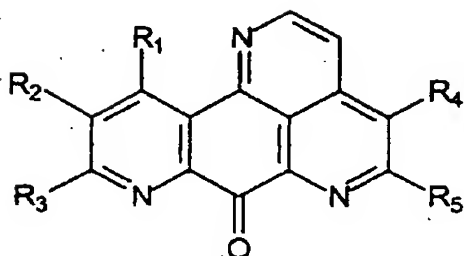
The compound of formulae (I) and (Ia) will be used in the treatment of the majority of solid tumours as a result of their powerful cytotoxic activities, in particular for treating cerebral tumours, lung cancers, ovarian and breast tumours, endometrium cancers,

colorectal cancers, prostate cancers and testicular tumours.

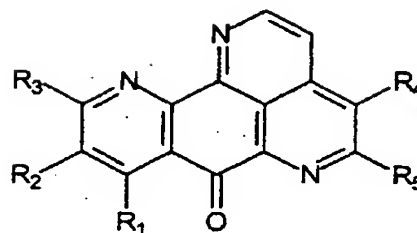


CLAIMS

1. Compounds of formula:



and



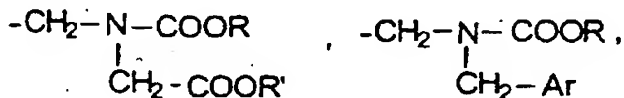
5

Formula I

Formula Ia

in which:

10  $R_1, R_2, R_3, R_4$  and  $R_5$  are selected from hydrogen, halogens,  $C_1$ - $C_6$  alkyl groups, hydroxyl,  $-CHO$ ,  $-OR$ ,  $-COOH$ ,  $-CN$ ,  $-CO_2R$ ,  $-CONHR$ ,  $-CONRR'$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$ ,  $-NHCOR$ , morpholino, nitro,  $SO_3H$  and



15

$R$  and  $R'$  being selected from  $C_1$ - $C_6$  alkyl groups and  $Ar$  being a  $C_6$ - $C_{14}$  aryl group, and the addition salts of these compounds with

20 pharmaceutically acceptable acids.

2. Compounds according to Claim 1, which are compounds of formula (I) in which:

25  $R_1, R_2, R_3, R_4$  and  $R_5$  are selected from hydrogen, halogens,  $C_1$ - $C_6$  alkyl groups, hydroxyl,  $-OR$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$  or  $-NHCOR$ ,  $R$  and  $R'$  being selected from  $C_1$ - $C_6$  alkyl groups, and the addition salts of these compounds with

30 pharmaceutically acceptable acids.

3. Compounds according to Claim 2, which are compounds of formula (I) in which:

5         $R_1$  is selected from hydrogen, halogens or hydroxyl, methoxy, nitro,  $-NH_2$ ,  $-NHCH_3$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$  or  $-NHCOCH_3$  groups,  $R_2$ ,  $R_3$  and  $R_5$  are hydrogen,  $R_4$  is a methoxy group,  
10        and the addition salts of these compounds with pharmaceutically acceptable acids.

4. Compounds according to Claim 1, which are compounds of formula (Ia) in which:

15         $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  and  $R_5$  are selected from hydrogen, halogens,  $C_1-C_6$  alkyl groups, hydroxyl,  $-OR$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$  or  $-NHCOR$ ,  $R$  and  $R'$  being selected from  $C_1-C_6$  alkyl groups,  
20        and the addition salts of these compounds with pharmaceutically acceptable acids.

5. Compounds according to Claim 4, which are compounds of formula (Ia) in which:

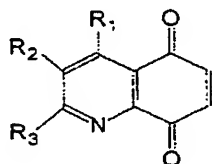
25         $R_1$  is selected from hydrogen, halogens or hydroxyl, methoxy, nitro,  $-NH_2$ ,  $-NHCH_3$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$  or  $-NHCOCH_3$  groups,  $R_2$ ,  $R_3$  and  $R_5$  are hydrogen,  
30         $R_4$  is a methoxy group, and the addition salts of these compounds with pharmaceutically acceptable acids.

6. Pharmaceutical composition comprising an effective amount of a compound selected from the compounds of formula (I) and (Ia) according to any one of Claims 1, 2, 3, 4 and 5 for treating, by virtue of  
35

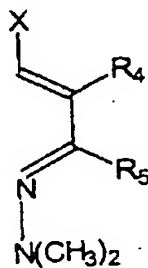
their cytotoxic properties, cancerous tumours and their metastases.

7. Use of the compounds as defined in Claims 1, 2, 3, 4 and 5 in the manufacture of an anticancer medicament.

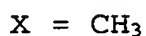
8. Process for the preparation of compounds according to Claim 1, which consists in reacting, according to a hetero Diels-Alder reaction, a quinolinedione of formula:



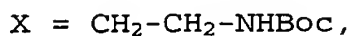
and an azadiene of formula



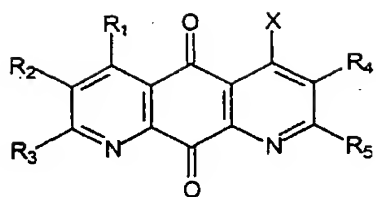
with



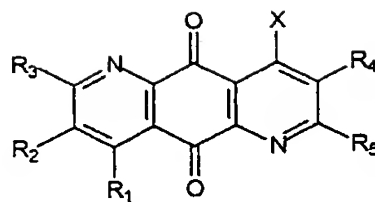
or



in order to obtain a mixture of compounds



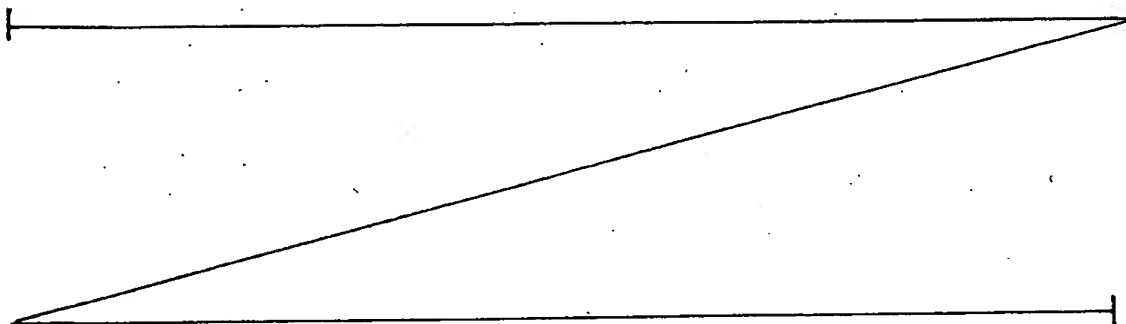
Formula II



Formula IIa

- 5 and, after separation of the compounds of formulae II and IIa, the separated compound is converted to a compound of formula I or Ia.

5



- 10 The compounds of formula (I) and (Ia) exhibit significant antitumour activity both *in vitro* and *in vivo* under the experimental conditions described above. They inhibit, *in vitro*, the growth of tumour cells, as indicated by the results of the MTT colorimetric tests.
- 15 They significantly and greatly inhibit, *in vivo*, the growth of HI-MXT and HS-MXT tumours and significantly increase the mean survival time of the median mouse of the batch of mice thus treated and grafted with lymphoma L 1210 with respect to the mean survival time
- 20 of the median mouse of the batch of control mice.

By virtue of their cytotoxic properties, the compounds of formulae (I) and (Ia), as described or in the form of acceptable pharmaceutical salts or solvates, can be

25 used as active principles of medicaments.

The compounds of formulae (I) and (Ia) are generally administered in dosage units drawn up either per  $m^2$  of body surface or per kg of weight. The said dosage units

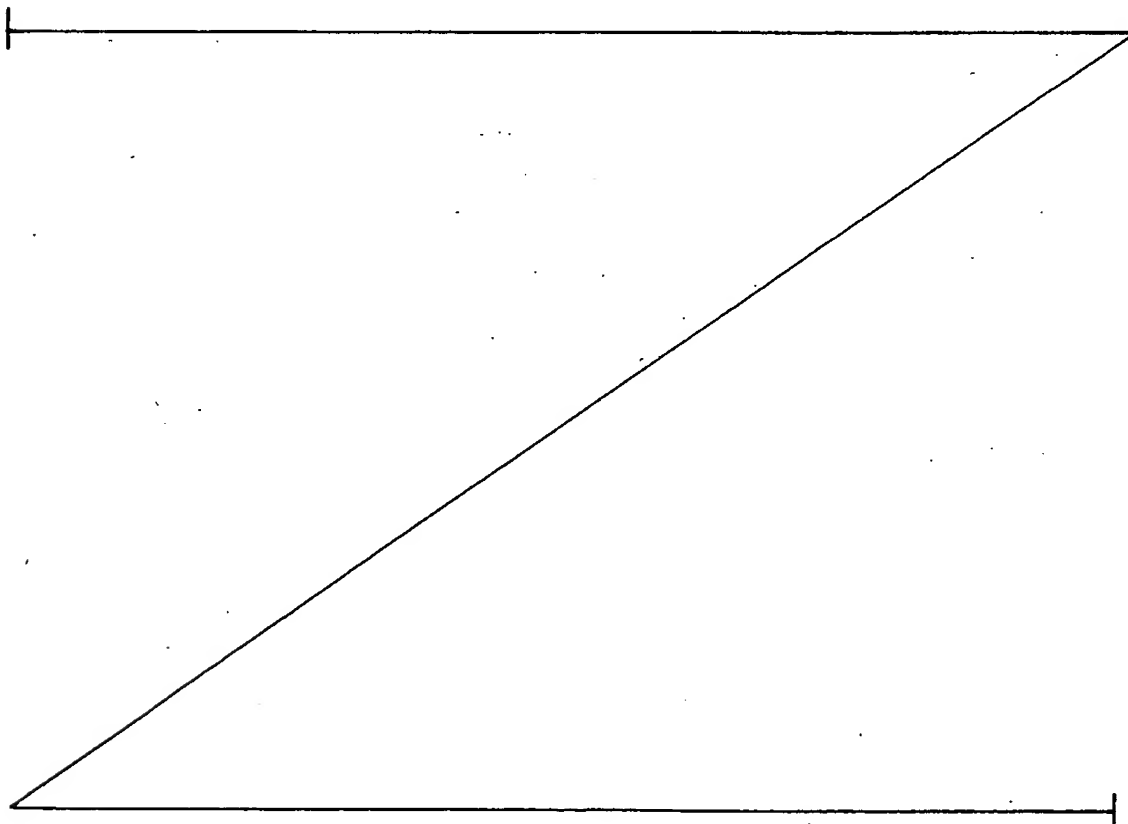
30 are preferably formulated in pharmaceutical compositions in which the active principle is mixed with one (or more) pharmaceutical excipient(s).

The compounds of formula (I) and (Ia) can be used,

35 according to the cancer pathology of the subject to be treated, at doses of between 0.05 and 350  $mg/m^2$  of body surface, preferably at doses of 0.5 to 50  $mg/m^2/day$  for the curative treatment in its acute phase, as a

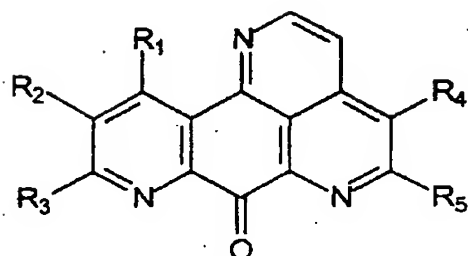
function of the number of treatment cycles of each cure. For a maintenance treatment, the compounds of formulae I will advantageously be used at doses of 0.05 to 25 mg/m<sup>2</sup>/day, preferably at doses of 0.1 to 1.5 mg/m<sup>2</sup>/day, according to the number of treatment cycles of the cure. They may be used in combination with antitumour medicaments used in protocols validated for intensive polychemotherapy.

- 10 In the pharmaceutical compositions of the present invention for oral or intravenous administration, the active principles can be administered in unit administration forms, as a mixture with conventional pharmaceutical vehicles suitable for human
- 15 therapeutics. The appropriate unit administration forms comprise forms to be taken orally, such as tablets, which may optionally be scored, or gelatin capsules, implants and intravenous administration forms.



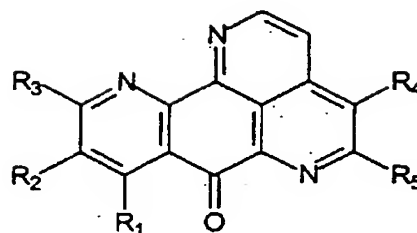
CLAIMS

1. Compounds of formula:



Formula I

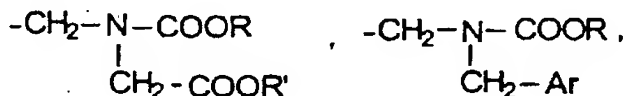
and



Formula Ia

in which:

$R_1, R_2, R_3, R_4$  and  $R_5$  are selected from hydrogen, halogens,  $C_1$ - $C_6$  alkyl groups, hydroxyl,  $-CHO$ ,  $-OR$ ,  $-COOH$ ,  $-CN$ ,  $-CO_2R$ ,  $-CONHR$ ,  $-CONRR'$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$ ,  $-NHCOR$ , morpholino, nitro,  $SO_3H$  and



$R$  and  $R'$  being selected from  $C_1$ - $C_6$  alkyl groups and  $Ar$  being a  $C_6$ - $C_{14}$  aryl group, and the addition salts of these compounds with pharmaceutically acceptable acids.

2. Compounds according to Claim 1, which are compounds of formula (I) in which:

$R_1, R_2, R_3, R_4$  and  $R_5$  are selected from hydrogen, halogens,  $C_1$ - $C_6$  alkyl groups, hydroxyl,  $-OR$ ,  $-NO_2$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$  or  $-NHCOR$ ,  $R$  and  $R'$  being selected from  $C_1$ - $C_6$  alkyl groups, and the addition salts of these compounds with pharmaceutically acceptable acids.

3. Compounds according to Claim 2, which are compounds of formula (I) in which:

5         $R_1$  is selected from hydrogen, halogens or hydroxyl, methoxy, nitro,  $-NH_2$ ,  $-NHCH_3$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$  or  $-NHCOCH_3$  groups,  $R_2$ ,  $R_3$  and  $R_5$  are hydrogen,  $R_4$  is a methoxy group,  
10        and the addition salts of these compounds with pharmaceutically acceptable acids.

4. Compounds according to Claim 1, which are compounds of formula (Ia) in which:

15         $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  and  $R_5$  are selected from hydrogen, halogens,  $C_1-C_6$  alkyl groups, hydroxyl,  $-OR$ ,  $NO_2$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$  or  $-NHCOR$ ,  $R$  and  $R'$  being selected from  $C_1-C_6$  alkyl groups,  
20        and the addition salts of these compounds with pharmaceutically acceptable acids.

5. Compounds according to Claim 4, which are compounds of formula (Ia) in which:

25         $R_1$  is selected from hydrogen, halogens or hydroxyl, methoxy, nitro,  $-NH_2$ ,  $-NHCH_3$ ,  $-NH-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$  or  $-NHCOCH_3$  groups,  $R_2$ ,  $R_3$  and  $R_5$  are hydrogen,  
30         $R_4$  is a methoxy group, and the addition salts of these compounds with pharmaceutically acceptable acids.

6. Pharmaceutical composition comprising an effective  
35        amount of a compound selected from the compounds of formula (I) and (Ia) according to any one of Claims 1, 2, 3, 4 and 5 for treating, by virtue of



their cytotoxic properties, cancerous tumours and their metastases.

- 5 7. Use of the compounds as defined in Claims 1, 2, 3, 4 and 5 in the manufacture of an anticancer medicament.
- 10 8. Process for the preparation of compounds according to Claim 1, which consists in reacting, according to a hetero Diels-Alder reaction, a quinolinedione of formula:

